



Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

**NUEVAS ENZIMAS TERMOESTABLES APLICADAS A  
LA SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS  
FARMACOLÓGICAMENTE ACTIVOS**



TESIS DOCTORAL  
Marcos Almendros Giménez  
Madrid 2011



Memoria presentada por Marcos Almendros Giménez para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid bajo la dirección de los Drs. José Berenguer Carlos y José Vicente Sinisterra Gago en el Departamento de Biología Molecular.

Madrid 2011







El **Dr. D. José-Vicente Sinisterra Gago**, catedrático de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la UCM y director del Servicio de Biotransformaciones Industriales (**SBI**) del Parque Científico de Madrid

**Hace Constar:** Que la parte experimental de la Tesis Doctoral del Sr. Marcos Almendros relacionada con las biotransformaciones y el análisis de productos se ha realizado en los laboratorios de **SBI** con el financiamiento del Grupo de Investigación de la **UCM**.

**Lo cual firmo** en Madrid a 17-Agosto de 2011-08-18

Fdo. Dr. J.V. Sinisterra



*En este momento en que miro atrás y recuerdo el primer día que comencé esta andadura que hoy toca a su fin, me viene a la memoria lo abrumador que me resultó afrontar este nuevo reto y asumir nuevas responsabilidades. Pero a lo largo de estos años he conocido a una gran cantidad de gente fantástica gracias a la cual lo que de otra manera hubiera sido una mera experiencia laboral ha resultado ser una inestimable experiencia vital. De todos vosotros he recibido y aprendido algo y a continuación intentaré agradeceréoslo, aunque unas pocas líneas no os hagan realmente justicia.*

*En primer lugar debo agradecer a mis directores José Vicente Sinisterra y José Berenguer todo su apoyo y consejo durante estos años. Gracias a vosotros he podido crecer y madurar como científico, me habéis enseñado a amar la ciencia y, sobre todo, me habéis demostrado que, por encima de mis directores de tesis, sois mis amigos. Por todo esto os debo mi más sincero agradecimiento.*

*También quiero agradecer al Parque Científico de Madrid que me haya permitido desarrollar gran parte de mi labor experimental en sus instalaciones, así como a todo al personal que os dedicáis a ofrecer un gran servicio día tras día.*

*De igual modo quiero agradecer al Prof. Manfred T. Reetz por haberme acogido en sus instalaciones en el Insituto Max-Planck de investigación en Mülheim an der Ruhr. Su amabilidad y constante apoyo me ha permitido conocer de primera mano uno de los mejores grupos de evolución dirigida del mundo, y me ha demostrado que su prestigio científico sólo es comparable a su calidad humana.*

*A los Drs. Andrés Alcántara y María José Hernáiz del departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la UCM, porque siempre me han brindado su ayuda y porque con su simpatía me han hecho sentir como en mi casa a lo largo de mis numerosas visitas.*

*A los Drs. José Manuel Guisán y Ángel Rumbero, así como a toda la gente de sus laboratorios por toda la colaboración prestada durante el desarrollo experimental de parte de esta tesis.*

*Y como no, a toda la gente que he conocido a lo largo de este tiempo en los diferentes centros en los que he tenido el placer de trabajar. Todos vosotros habéis hecho del laboratorio un lugar en el que nunca ha faltado ni una risa, ni un apoyo, ni un consejo, ni, por encima de todo, cinco minutos para tomar un café y compartir una y otra vez nuestras anécdotas. Muchos sois los que habéis formado parte de mi vida estos años, pero es justo que haga un esfuerzo para*

*enumeraros a todos. Así, espero poder devolveros, aunque sea una mínima parte, todo lo que me habéis dado:*

*A la gente del Parque Científico de Madrid: mis metaleros hermanos Carlos y Nacho, toda la gente de Proalt, muy especialmente Mari y Juan Ignacio, las “Decanteras” Macu y Ana, María, Risco, Clara, Sarita, Tomé, Pepiño, el incombustible sector portugués formado por (según orden cronológico) Vera, Dulce, Sofía, Malafaial y muy especialmente el decimonónico Zé, que me hizo enamorarse de la ciudad de Coimbra, así como los que nos han visitado desde allende las fronteras de los Pirineos: Rubén “Manito” de Regil, Manuel, Antonella y Saúl (nos vemos en Nápoles).*

*A la gente del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, los que están, los que empiezan y los que ya se fueron: Daniel, Eloy, Emilio, Noé, Carol, Akbar, Carlos, Laura, Fede, Mariajo, Esther, Yamal, Leticia, Aurelio, Ángel, Felipe, Ana y Zahra. Porque sin vosotros el 109 no sería el mejor laboratorio del CBM.*

*A la gente de Mülheim an der Ruhr: Frederik y Cris, porque me hicisteis sentir como si os conociera de toda la vida, Jordi y Loreto, a los que os debo mil fiestas, Emine, Yossie, Pablo y Jimena, Sabrina, Markus y todos los demás.*

*Por supuesto, tampoco me quiero olvidar de todos vosotros: Andrés, por compartir conmigo más Jueves de los que puedo contar y por haberme dedicado tu tiempo siempre que lo he necesitado, Javi, Carlos, Quique, Laura y Marta, por todo lo que vivimos durante la carrera, y por todo lo que hemos compartido después, así como Guille, Alfonso y Franz. A todos vosotros quiero que estas líneas os sirvan como homenaje. Por mucho tiempo que pase, y aunque la vida nos separe en algún momento, siempre os consideraré mi segunda familia.*

*A Julia, por haberme dedicado todos estos años de tu vida y haberme aportado cariño y comprensión, por haberme escuchado en mis malos ratos, por haber soportado mis dudas, cansancios y frustraciones. Tú, más que nadie, te mereces un sobresaliente.*

*Y por último, pero no menos importante, a toda mi familia, que ha sido quien más ha sufrido mis malos humores, por su eterna comprensión e insaciable curiosidad, os quiero dedicar muy especialmente el fruto de este trabajo, porque si a alguien le debo el haber llegado hasta aquí es a vosotros.*

*A todos, gracias.*





# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	I
<b>ABSTRACT</b>	V
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 LOS LÍMITES DE LA VIDA	1
1.2 MICROORGANISMOS TERMÓFILOS	2
1.2.1 El género <i>Thermus</i>	4
1.3 BASES MOLECULARES DE LA TERMOFILIA	5
1.3.1 Ácidos nucleicos	5
1.3.2 Lípidos y membranas	6
1.3.3 Metabolitos	7
1.3.4 Proteínas	8
1.4 TERMOZIMAS EN BIOCATÁLISIS	10
1.4.1 Mejora del biocatalizador mediante evolución dirigida	11
1.4.2 Inmovilización del biocatalizador	14
1.5 NUCLEÓSIDOS: ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y APLICACIÓN	16
1.5.1 Modificación enzimática	18
1.5.2 Síntesis combinatorial	19
1.5.2.1 Nucleósido-desoxirribosiltransferasas	19
1.5.2.2 Nucleósido fosforilasas	20
<b>2 OBJETIVOS</b>	27

<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
<b>3.1 MATERIAL BIOLÓGICO</b>	<b>31</b>
3.1.1 Cepas	31
3.1.2 Plásmidos	31
3.1.3 Plásmidos contruidos	32
3.1.4 Oligonucleótidos	33
<b>3.2 MATERIAL QUÍMICO Y BIOLÓGICO</b>	<b>34</b>
3.2.1 Medios de cultivo	34
3.2.2 Soluciones y tampones	35
3.2.3 Nucleósidos y bases nitrogenadas	35
<b>3.3 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS</b>	<b>36</b>
3.3.1 Crecimiento y conservación de las cepas	36
3.3.2 Transformación de <i>E. coli</i>	36
3.3.2.1 Choque térmico	36
3.3.2.2 Electroporación	37
<b>3.4 MANIPULACIÓN DEL ADN</b>	<b>38</b>
3.4.1 Preparación de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	38
3.4.2 Preparación de ADN cromosómico de <i>T. thermophilus</i> HB27	38
3.4.3 Amplificación y clonación del ADN	38
3.4.3.1 Clonación de genes del cromosoma de <i>T. thermophilus</i> HB27	38
3.4.3.2 Creación de librerías de mutantes por ISM	40
3.4.4 Electroforesis y purificación de ADN	41
<b>3.5 MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS</b>	<b>41</b>
3.5.1 Electroforesis en condiciones desnaturizantes	41
3.5.2 Expresión de proteínas de <i>T. thermophilus</i> HB27 en <i>E. coli</i> BL21(DE3)	42
3.5.3 Purificación por desnaturización diferencial	42



<b>3.5.4 Purificación por cromatografía de intercambio iónico</b>	43
<b>3.5.5 Ensayos enzimáticos</b>	43
3.5.5.1 Síntesis de nucleósidos empleando células enteras	43
3.5.5.2 Fosforólisis de nucleósidos empleando enzimas	45
3.5.5.3 Síntesis de nucleósidos empleando enzimas	45
3.5.5.4 Cribado en placas multipocillo	46
<b>3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS</b>	46
<b>3.7 ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA</b>	47
3.7.1 Velocidad de sedimentación	47
3.7.2 Equilibrio de sedimentación	48
<b>3.8 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS EN SOPORTE SÓLIDO</b>	48
3.8.1 Soportes empleados	48
3.8.2 Inmovilización de enzimas sobre soportes covalentes	48
3.8.2.1 Inmovilización de enzimas sobre soportes funcionalizados con grupos epóxido	48
3.8.2.2 Inmovilización de enzimas sobre soportes funcionalizados con grupos aminoepóxido	49
3.8.3 Inmovilización de enzimas sobre soportes iónicos	50
<b>3.9 ANÁLISIS CONFORMACIONAL EDIANTE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA</b>	50
<b>3.10 HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS</b>	50
3.10.1 Análisis de secuencias	50
3.10.2 Modelado por homología y <i>docking</i> molecular	51
3.10.3 CASTing	51
<b>4 RESULTADOS</b>	55
<b>CAPÍTULO 1. SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS EMPLEANDO CÉLULAS DE <i>T. thermophilus</i></b>	55

4.1.1 Reacciones de síntesis de nucleósidos catalizadas por células enteras de <i>T. thermophilus</i>	55
4.1.1.1 Selectividad frente a la base purínica y estructura del anillo de purinas	55
4.1.1.2 Selectividad frente a la pirimidina del nucleósido donador	58
4.1.2 Influencia del pH y la relación molar de sustratos en la productividad de la síntesis	60
<b>CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN, EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUCLEÓSIDO FOSFORILASAS DE <i>T. Thermophilus</i> HB27</b>	61
4.2.1 Búsqueda de genes homólogos	61
4.2.2 Clonación, expresión y purificación de posibles NPs de <i>T. thermophilus</i> HB27	64
4.2.3 Ensayos de actividad fosforilasa	66
4.2.4 Ensayos de actividad sintasa	68
4.2.5 Fosforólisis y síntesis de análogos de nucleósidos	70
4.2.6 Optimización de los parámetros de reacción en la fosforólisis de nucleósidos	73
4.2.7 Determinación de los parámetros cinéticos	75
4.2.8 Determinación de la estructura cuaternaria	77
4.2.8.1 Velocidad de sedimentación	77
4.2.8.2 Equilibrio de sedimentación	78
<b>CAPÍTULO 3. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE TtPNPI, TtPNPII Y TtPyNP. FORMULACIÓN DE UN MODELO CATALÍTICO DE TtPyNP Y MODIFICACIÓN DE SU ESPECIFICIDAD POR EVOLUCIÓN DIRIGIDA</b>	79
4.3.1 Estudios conformacionales	79
4.3.1.1 Influencia de la temperatura y los cationes divalentes sobre la actividad	80
4.3.1.2 Espectroscopía de fluorescencia	82
4.3.2 Modificación de la especificidad de TtPyNP mediante la metodología de evolución dirigida	86

4.3.2.1 Modelado por homología	86
4.3.2.2 Generación de un modelo estructural y catalítico de TtPyNP	87
4.3.2.3 Selección de residuos por CASTing	90
4.3.2.4 Creación de librerías de mutantes por ISM	91
4.3.2.5 Evaluación de las librerías	92
<b>CAPÍTULO 4. INMOVILIZACIÓN DE LAS ENZIMAS EN SOPORTE SÓLIDO</b>	<b>95</b>
<b>4.4.1 Actividad retenida</b>	<b>95</b>
<b>4.4.2 Termoestabilización por inmovilización</b>	<b>96</b>
<b>5 DISCUSIÓN</b>	<b>103</b>
<b>6 CONCLUSIONES</b>	<b>119</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>123</b>







Abreviatura	Nombre completo	Categoría
5FC	5-fluorocitosina	Base nitrogenada
5IU	5-yodouracilo	Base nitrogenada
A	Adenina	Base nitrogenada
BI	Benzimidazol	Base nitrogenada
C	Citosina	Base nitrogenada
DAP	2,6-diaminopurina	Base nitrogenada
DFU	2-desoxi-2-fluorouracilo	Base nitrogenada
FMxPy	5-fluoro-2-metoxi-4(1H)pirimidinona	Base nitrogenada
G	Guanina	Base nitrogenada
HX	Hipoxantina	Base nitrogenada
T	Timina	Base nitrogenada
tFmU	6-trifluorometil-uracilo	Base nitrogenada
U	Uracilo	Base nitrogenada
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani	Medio de cultivo
LB <sub>A100</sub>	Medio de cultivo Luria-Bertani suplementado con ampicilina 100 µg/mL	Medio de cultivo
M9	Medio mineral de <i>E. coli</i>	Medio de cultivo
M9 <sub>A100</sub>	Medio mineral de <i>E. coli</i> suplementado con ampicilina 100 µg/mL	Medio de cultivo
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression	Medio de cultivo
TB	Medio de cultivo de <i>Thermus</i>	Medio de cultivo
ACV	Aciclovir	Nucleósido
Ado	Adenosina	Nucleósido
ara-A	Adenina-arabinósido	Nucleósido
ara-U	Uracilo-arabinósido	Nucleósido
AZT	Azidotimidina	Nucleósido
Ctd	Citidina	Nucleósido
dAdo	2'-desoxiadenosina	Nucleósido
dCtd	2'-desoxicitidina	Nucleósido
dGuo	2'-desoxiguanosina	Nucleósido
dIno	2'-desoxiinosina	Nucleósido
dUrd	2'-desoxiuridina	Nucleósido
Guo	Guanosina	Nucleósido
Ino	Inosina	Nucleósido

Thd	Timidina	Nucleósido
Urd	Uridina	Nucleósido
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido	Reactivo
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido	Reactivo
DEAE	Dietilaminoetilo	Soporte
EC-EP	Soporte funcionalizado con grupos epóxido	Soporte
EC-HFA	Soporte funcionalizado con grupos aminoepóxido	Soporte
MANAE	Soporte derivado de monoamino-N-aminoetilo	Soporte
PEI	Soporte derivado de polietilenimina	Soporte
Q	Soporte funcionalizado con aminas cuaternarias	Soporte
CAST	Combinatorial Active-site Saturation Test	Técnica
ISM	Iterative Saturation Mutagenesis	Técnica
PCR	Polimerase Chain Reaction	Técnica
DO	Densidad óptica	Término
T <sub>m</sub>	Melting temperature	Término
NP	Nucleósido fosforilasa	Enzima
NdRT	N-2'-desoxirribosiltransferasa	Enzima
PNP	Purín nucleósido fosforilasa	Enzima
PyNP	Pirimidín nucleósido fosforilasa	Enzima
UP	Uridín fosforilasa	Enzima
TP	Timidín fosforilasa	Enzima



## **ABSTRACT**



In the long-running history of biocatalysis, the last decades have seen an increasing interest in the use of enzymes in substitution for traditional chemical processes. Enzymes bring notable advantages, such as higher specificity and efficiency in bioconversions due to their regio- and stereoselectivity. Also, since they allow eliminating organic solvents and other contaminants, their use lessens the environmental impact of the reactions, a critical subject in a human society aiming for sustainability. In this regard, great efforts have been made in widening the array of enzymes able to perform either new enzymatic reactions or enhance previously available ones. During the last years, thermophilic microorganisms have received a special attention as sources for new biocatalyst. This is due to the increased thermostability and resistance to denaturation they offer in comparison with mesophilic enzymes, which allows more flexible conditions and longer half lives when used at an industrial scale.

The aim of this Thesis is the identification of new biotechnologically interesting enzymatic activities in thermophilic microorganisms, with the aim of overproducing and characterizing a number of these enzymes for their application in a biocatalytical process. Several test reactions were performed on a set of eleven strains of *Thermus thermophilus*. The reaction of synthesis of nucleosides analogues by transglycosilation was considered particularly promising.

Three novel nucleosides phosphorylases from *T. thermophilus* HB27 were identified as the enzymes involved in the transglycosilation. These enzymes were cloned and characterized in regards to their specificity, kinetic properties and quaternary structure. The reaction parameters were optimized. The enzymes showed remarkable properties derived from their thermophilic nature, such as a wide range of optimal pH and activity beyond water-boiling point. We described for the first time the synthesis of compounds with therapeutical properties, using a thermophilic nucleoside phosphorylase at temperatures up to 80°C. After biochemical characterization, the selectivity against arabinose nucleosides of one of the enzymes was enhanced in a 30% by Directed Evolution. Finally, the enzymes were immobilized onto solid supports, obtaining derivates that retained the enzymatic activity while enhancing their natural thermostability.

As a result of our work, three new thermostable nucleoside phosphorylases, active in the synthesis of derivates of 2,6-diaminopurine, 5-halouracil or arabinose nucleosides, currently applied in the treatment of several human diseases, are described. These enzymes show enhanced properties compared to currently available mesophilic nucleosides phosphorylases. Our results involve the enhancement of the production of biotechnologically important enzymes that will permit a higher efficient synthesis of therapeutically relevant compounds at a reduced cost and hence a broader availability for the increased global demand for new drugs and treatments.







## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 LOS LÍMITES DE LA VIDA

Resulta difícil definir qué condiciones son necesarias para la vida. En su búsqueda más allá de las fronteras de la Tierra, el ser humano ha formulado una definición de las mismas basándose en parámetros que son válidos en nuestro planeta como criterio de identificación de hábitats potenciales. Sin embargo, y aunque esto no implique necesariamente que sistemas biológicos organizados bajo diferentes premisas, como por ejemplo el uso de un disolvente universal distinto del agua, no sean posibles, la ausencia de un modelo alternativo en la Tierra nos obliga a restringir la búsqueda de potenciales nichos ecológicos a aquellos que presentan similitud con los de nuestro planeta. Existe, por lo tanto, un concepto de condiciones estándar cuyo valor central, u “óptimo”, se dibuja sobre aquellas que son aplicables al ser humano: temperaturas en el rango de los 20 y 25°C, valores de pH neutros, presión atmosférica y atmósfera oxidante. Sin embargo, desde la introducción del concepto de termofilia por Brock (Brock, 1985) hasta la actualidad, estos límites impuestos por nuestro conocimiento se han visto ampliados paulatinamente, y cada vez conocemos más ejemplos de organismos capaces de acomodarse a condiciones que se alejan radicalmente del estándar, en ocasiones llevando a cabo adaptaciones tan profundas en sus mecanismos moleculares fundamentales que se hacen dependientes de las mismas. No obstante, y debido a la necesidad de sistematizar el concepto de condición extrema, se han propuesto diferentes definiciones. Una de ellas es la que denomina *ambiente extremo* a aquel que requiere grandes modificaciones en los organismos que lo habitan (Boston, 1999), si bien parte de la comparación con un modelo cuyas características adaptativas deberían ser consideradas neutras. Otra definición que se aleja del punto de vista antropocéntrico define *ambiente extremo* como aquél cuyas limitaciones imponen una baja diversidad biológica, encontrándose ejemplos de ecosistemas que se componen de una única especie (Chivian y cols., 2008).

Las adaptaciones encontradas en estos organismos extremófilos cubren un amplio espectro de variables fisicoquímicas que permiten su clasificación. Así, atendiendo a la temperatura de crecimiento óptimo, encontramos organismos psicrófilos cuando ésta se sitúa por debajo de los 20°C (ej. géneros *Pseudoalteromonas* o *Shewanella*), mesófilos cuando se sitúa entre los 20 y los 40°C y diferentes grados de termófilos cuando es superior a 40°C (ej. géneros *Thermus* o *Pyrolobus*). También podemos hablar de halófilos cuando habitan entornos con alta fuerza iónica (ej. género *Halomonas*), de acidófilos o alcalófilos cuando habitan pHs

extremos (ej. géneros *Acidiphilium* o *Bacillus*) o de piezófilos (antes barófilos) que crecen sometidos a altas presiones (ej. género *Colwellia*). Otras categorías atienden a características más específicas como los xerófilos, que crecen en condiciones de baja humedad, los metalófilos o los microaerófilos. Además, dado que es frecuente que un hábitat extremo presente múltiples condiciones simultáneamente, existen abundantes ejemplos de extremófilos múltiples (Mesbah y Wiegel, 2008).

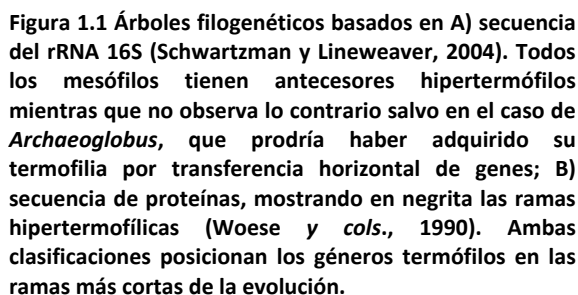
Los ejemplos de extremófilos anteriormente mencionados ponen de manifiesto una representación mayoritaria de los dominios Archaea y Bacteria, debido a su flexibilidad genética y a unos tiempos de generación cortos que aceleran los procesos evolutivos de adaptación y selección. Sin embargo, existen notables ejemplos de organismos multicelulares pertenecientes al reino Eukarya que han desarrollado sistemas de adaptación a condiciones extremas, como el poliquétido marino *Alvinella pompejana*, capaz de vivir en fuentes hidrotermales a 80°C de temperatura (Desbruyères y Laubier, 1980), psicrofilos como los insectos pertenecientes al suborden Grylloblattodea (Erwin, 1996) o el crustáceo *Euphausia superba* (Hamner y cols., 1983), y el que quizá sea el ejemplo más sorprendente de todos, el de los artrópodos pertenecientes al filo Tardigrada, que en condiciones adversas adoptan una forma letárgica en la que han mostrado resistencia a temperaturas cercanas al cero absoluto (Becquerel, 1950), radiaciones extremas (Horikawa y cols., 2006) y períodos prologados de sequía (Guidetti y Jönsson, 2002), e incluso han sobrevivido durante días adheridos al exterior de vehículos en órbita espacial alrededor de la Tierra (Jönsson y cols., 2008).

### 1.2 MICROORGANISMOS TERMÓFILOS

Dentro de los diferentes tipos de extremófilos, los termófilos han sido en las últimas décadas objeto de especial interés para la comunidad científica debido a sus implicaciones evolutivas y bioquímicas. En su mayoría son microorganismos pertenecientes a los dominios Bacteria y Archaea, y, según su temperatura óptima de crecimiento, se pueden dividir en termófilos moderados (45-65°C), termófilos extremos (65-80°C) e hipertermófilos (>80°C). Entre las bacterias, las mayores temperaturas de crecimiento observadas se sitúan en 90 y 95°C para *Thermotoga marítima* y *Aquifex pyrophilus*, respectivamente. Sin embargo, son especies pertenecientes al dominio Archaea las que han mostrado las mayores temperaturas de crecimiento óptimo, con ejemplos como el de *Pyrolobus fumarii*, capaz de crecer a una temperatura máxima de 113°C (Blochl y cols., 1997). Actualmente, el límite superior de la vida



El estudio de estos microorganismos tiene un particular interés evolutivo, ya que tanto en los árboles filogenéticos basados en ARNr 16S (Schwartzman y Lineweaver, 2004) como en los basados en duplicados de secuencias proteicas (Iwabe y cols., 1989; Woese y cols., 1990), los hipertermófilos ocupan las ramas más cortas y profundas (Figura 1.1), dibujando una línea temporal de la Tierra donde parte de las especies se habría adaptado paulatinamente a temperaturas más bajas según el planeta reducía su temperatura, mientras los termófilos habrían quedado confinados a los que actualmente son sus nichos ecológicos (Wachtershauser, 1998).



3

### 1.2.1 El género *Thermus*

Dentro de los microorganismos termófilos, *Thermus* es quizá el género más paradigmático. En la actualidad se conocen cientos de cepas pertenecientes a este género (Brock y Freeze, 1969), aisladas en diferentes puntos del planeta. Este género está representado por bacilos inmóviles de tinción Gram-negativa que crecen formando filamentos concatenados en cultivos exponenciales, que son separados por fisión binaria al alcanzar la fase estacionaria, y que suelen acumular carotenoides que les proporcionan un color amarillo-anaranjado. En su amplia mayoría son aerobios, siendo el oxígeno el único aceptor de electrones que permite el crecimiento en muchas cepas (Da Costa y cols., 2001), aunque se conocen cepas facultativas de *Thermus thermophilus* que crecen en anaerobiosis por desnitrificación parcial o total (Cava y cols., 2008).

Evolutivamente, estudios comparativos del ARNr 16S y de las secuencias de proteína de los miembros de este género les han situado junto al género *Deinococcus*, formando una rama filogenética independiente del árbol bacteriano (Weisburg y cols., 1989; Griffiths y Gupta, 2004; Omelchenko y cols., 2005; Griffiths y Gupta, 2007). Estudios de genómica comparativa han propuesto que tras la divergencia de ambos géneros a partir de un antecesor mesófilo, *Thermus* adquirió su carácter termófilo por transferencia horizontal de genes tanto de bacterias como de arqueas hipertermófilas, mientras que *Deinococcus* mantuvo su carácter mesófilo y adquirió otras resistencias, como la radioresistencia exhibida por *D. radiodurans*, y que los correspondientes genes adaptativos se alojan en un megaplásmido de origen común y de gran variabilidad (Omelchenko y cols., 2005). La posición filogenética del filo *Deinococcus-Thermus* es, sin embargo, menos clara y aún constituye motivo de debate. Estudios comparativos del ARNr 16S la sitúan como una de las ramas más antiguas del dominio Bacteria, tras *Thermotoga* y *Aquifex* (Woese, 1987), mientras que otros estudios, basados en el análisis de *Indels* (inserciones y deleciones en proteínas) y de la estructura de la envuelta celular, sitúan a este filo en una posición intermedia entre Gram-positivos y Gram-negativos (Gupta, 2000). La secuenciación de nuevos genomas ha permitido realizar análisis de COGs (*Cluster of Orthologous Groups*) que han apoyado esta última teoría (Ciccarelli y cols., 2006).

La facilidad de su crecimiento y mantenimiento en el laboratorio, la creciente disponibilidad de genomas en las bases de datos, y características como la competencia natural que presentan los microorganismos del género *Thermus*, que pueden incorporar ADN exógeno a una velocidad de hasta 40 kb.s<sup>-1</sup> (Averhoff y Muller, 2010), así como la facilidad de cristalización de sus proteínas, han hecho de este género un modelo ideal para el estudio de

las bases moleculares de la termofilia (Cava y cols., 2009), y ha dado lugar a un programa de genómica estructural dedicado a la cepa *T. thermophilus* HB8 (Jenney y Adams, 2008).

### 1.3 BASES MOLECULARES DE LA TERMOFILIA

Los microorganismos termófilos deben enfrentarse constantemente a la degradación y desensamblaje de los complejos macromoleculares que los componen a causa de las temperaturas a las que proliferan. Se han llevado a cabo amplios estudios de las adaptaciones que presentan los microorganismos hipertermófilos, en especial arqueas, tanto de estabilidad conformacional de proteínas y ácidos nucleicos, como de fluidez de membranas y estabilidad química de metabolitos esenciales. Aunque se ha observado que estos organismos presentan modificaciones en ocasiones muy sustanciales, sobre todo en aquellos organismos que crecen a más de 90°C, no se ha conseguido establecer una sistemática acerca de las bases moleculares de la termofilia, siendo difícil discernir las variaciones, encontradas tanto en bacterias como en arqueas, que se atribuyen a una adaptación a las altas temperaturas de aquellas otras que se deben a la separación filogenética entre especies (Daniel y Cowan, 2000). Además, debido a la dificultad de llevar a cabo estudios *in vivo*, la amplia mayoría de los datos disponibles acerca de la termoestabilidad de macromoléculas y metabolitos se han obtenido *in vitro*, donde es muy difícil replicar las condiciones fisicoquímicas del citoplasma de estos microorganismos. Por lo tanto, la verdadera magnitud del efecto que tiene la temperatura sobre los sistemas biológicos aún no puede ser verificada, por lo que el límite superior para la vida podría elevarse por encima de los actualmente propuestos 140°C.

A continuación se describen las modificaciones más comunes observadas en ácidos nucleicos, lípidos, metabolitos y proteínas.

#### 1.3.1 Ácidos nucleicos

Cuando se someten a altas temperaturas, los ácidos nucleicos sufren desnaturalización por separación de la doble cadena, y se producen modificaciones degradativas espontáneas sobre las pentosas y las bases nitrogenadas, por lo que las estrategias desarrolladas por estos microorganismos al respecto están orientadas a la preservación de la estructura y a un sistema de reparación eficiente.

Tanto en bacterias como en arqueas, se han observado altas concentraciones intracelulares de sales como el di-inositol-1,1'-fosfato potásico (Scholz y cols., 1992) y el 2,3-difosfoglicerato cíclico (Hensel y König, 1988), que estabilizan la estructura secundaria de los ácidos nucleicos, así como poliaminas policatiónicas tales como putrescina, espermidina, norespermidina, termoespermidina y espermina, que aumentan la temperatura de fusión del ADN (Friedman y Oshima, 1989). Aunque el aumento del contenido G+C se relaciona de manera directamente proporcional con la temperatura de desnaturalización del ADN, no se ha podido establecer una correlación entre el contenido molar de estos nucleótidos y la temperatura máxima; sin embargo, el contenido en G+C del ARNr 16S es significativamente más alto en arqueas hipertermófilas (Grogan, 1998). Más generalizada, tanto en arqueas como en bacterias, es la existencia de una topoisomerasa I dependiente de ATP (girasa reversa) que introduce superenrollamientos positivos en la doble cadena de ADN (Kikuchi y Asai, 1984), así como la asociación con proteínas catiónicas similares a histonas, formando estructuras estables similares a nucleosomas en arqueas (Pereira y cols., 1997). Además, debido a la pérdida espontánea de bases, generando sitios apurínicos y apirimidínicos, y a la desaminación de citosina y 5-metilcitosina que se produce espontáneamente a altas temperaturas, existe un mayor requerimiento de una maquinaria de reparación eficiente, habiéndose identificado homólogos de diferentes sistemas de reparación de escisión de base, desaminación y recombinación tanto en bacterias como en arqueas (Grogan y cols., 1998).

Finalmente, los microorganismos termófilos deben adoptar estrategias orientadas a preservar la integridad del ARNt debido a la fuerte relación estructura-función del mismo. En arqueas, este problema se aborda fundamentalmente mediante modificación post-transcripcional tanto de la base como de la ribosa, siendo la modificación más extendida la metilación de la ribosa en posición 2' (Edmonds y cols., 1991), sin embargo, la información disponible acerca de los mecanismos adoptados por bacterias a este respecto sigue siendo limitada.

### 1.3.2 Lípidos y membranas

La regulación de la fluidez de la membrana juega un factor clave en el correcto funcionamiento de la membrana lipídica. En organismos mesófilos, ésta se compone de fosfolípidos cuyo contenido de ácidos grasos insaturados determina el estado de fluidez de la misma. Sin embargo, las altas temperaturas de los hábitats que ocupan los organismos termófilos, y en especial los hipertermófilos, que sufren acusadas fluctuaciones de

temperatura, precisan de una composición de membrana diferente para mantener su función. Las estrategias adoptadas por arqueas y bacterias difieren en este punto.

La membrana típica de arqueas hipertermófilas está compuesta por una monocapa de di-bifitanil-di-glicerol-tetraéter (40C) en los que se reemplazan los enlaces éster, típicos de mesófilos, por enlaces éter más estables que previenen la degradación de los componentes de membrana. También se sustituyen los ácidos grasos por fitanol, que permite mayor grado de empaquetamiento, lo que otorga una mayor cohesión y reduce el grado de libertad traslacional de la membrana (De Rosa y cols., 1986; Langworthy y Pond, 1986; Kates, 1993). Los componentes de membrana de arqueas pueden presentar grandes modificaciones tanto en las cadenas de fitanol (Gliozzi y cols., 1983) como en las cabezas polares, que se conjugan con residuos glicosídicos para proporcionar mayor estabilidad (van de Vossenberg y cols., 1998). La regulación del grado de modificación de estos componentes de membrana obedece a una respuesta adaptativa frente a fluctuaciones de la temperatura. Además, las características químicas de las membranas de arqueas no sólo se traducen en una mayor estabilidad térmica, sino en una mayor resistencia a ruptura mecánica (Ring y cols., 1986).

En el caso de bacterias hipertermófilas (Géneros *Aquifex* y *Thermotoga*), las membranas tienden a imitar a sus contrapartes en arqueas (Forterre, 1998), si bien mantienen en todo caso la estructura de bicapa. Pueden presentar enlaces diéter con alcoholes grasos, tetraésteres y dioles alifáticos de cadena larga, así como fuertes modificaciones en los componentes de membrana mediante conjugación con residuos fosfo- sulfo- o glicosídicos. La regulación del estado de fluidez reside en la longitud, grado de saturación y modificación por ciclación y/o ramificación de las cadenas alifáticas (Tolner y cols., 1997).

### **1.3.3 Metabolitos**

Uno de los puntos más controvertidos de la termoadaptación es el hecho de que determinados metabolitos esenciales sufren degradación espontánea por encima de determinadas temperaturas. Así, cofactores como el NAD(P)<sup>+</sup> o el piridoxal fosfato, intermediarios metabólicos como el acetil-fosfato o sistemas de reserva energética como el ATP/ADP resultan totalmente degradados en 3 horas a 105°C (Daniel y Cowan, 2000). No obstante, hay que destacar que estos son datos obtenidos *in vitro*, y que chocan con la observación experimental de que dichos metabolitos existen en arqueas que crecen a temperaturas superiores.

Las estrategias adoptadas por los microorganismos termófilos para solventar este problema siguen sin esclarecerse. No obstante, se conoce que las condiciones de pH y fuerza iónica o la presencia de iones metálicos en el citoplasma generan un microentorno que afecta de manera ostensible a la estabilidad de compuestos como el NAD y el ATP (Lowry y cols., 1961; Tetas y Lowenstein, 1963; Ramirez y Marecek, 1980; Walsh y cols., 1983; Hudson y cols., 1993; al-Habori, 1995). Además, una estrecha unión física de enzimas implicadas en una misma ruta, no sólo incrementa el flujo de la misma (Kholodenko y cols., 1996; Kholodenko y cols., 1996; Mendes y cols., 1996), sino que reduce la concentración de intermediarios inestables, como se ha observado en *Pyrococcus furiosus* (Legrain y cols., 1995). No obstante, ninguna de estas características se observa de manera generalizada, y el hecho empírico de que metabolitos inestables hayan sido detectados en el citoplasma de microorganismos creciendo por encima de 100°C pone de manifiesto que se estabilizan de algún modo a temperaturas superiores a las determinadas *in vitro*.

Además, se han observado otras adaptaciones de ruta metabólica, como la sustitución de enzimas asociadas a grupos hemo que requieren NAD(P)<sup>+</sup> como cofactor por oxidorreductasas asociadas a ferredoxina (Mukund y Adams, 1991; Johnson y cols., 1993; Iwasaki y cols., 1994; Mai y Adams, 1994; Smith y cols., 1994; Iwasaki y cols., 1995; Heider y cols., 1996) o sustitución o eliminación de intermediarios metabólicos inestables mediante el desarrollo de rutas metabólicas alternativas (Schäfer y cols., 1993; Siebers y Hensel, 1993; Kengen y cols., 1994). Sin embargo, no existen pruebas de que estas estrategias se apliquen sistemáticamente y que por lo tanto sean verdaderas adaptaciones de sistemas hipertermófilos (Daniel y Danson, 1995).

### 1.3.4 Proteínas

De todas las adaptaciones que presentan los microorganismos termófilos, la termoestabilización de proteínas ha sido objeto de especial estudio (Blake y cols., 1991; Auerbach y cols., 1998; Russell y cols., 1998). Debido a que el plegamiento de una proteína, esencial para el desempeño de su función, depende de un delicado equilibrio entre interacciones inter- e intramoleculares estabilizantes y de factores desestabilizantes, y que un aumento de la temperatura conlleva pérdida de estructura por desnaturalización, numerosos estudios se han centrado en la búsqueda de grandes modificaciones estructurales o de composición en aminoácidos (Fields, 2001). Sin embargo, los datos de los que disponemos en la actualidad han puesto de manifiesto que tanto la estructura como el mecanismo catalítico

de las enzimas termófilas, o termozimas, son sorprendentemente parecidas a las de sus contrapartes mesófilas. Al igual que ocurre con las modificaciones anteriormente expuestas en relación a la estabilización de ácidos nucleicos o metabolitos inestables, se conocen diferencias estructurales entre proteínas con diferente estabilidad térmica sin que se observe un patrón adaptativo sistemático (Li y cols., 2005).

Las diferencias observadas entre proteínas termófilas y mesófilas se pueden resumir en los dos puntos siguientes:

i) Incremento del número de interacciones

Las interacciones inter- e intramoleculares contribuyen significativamente a la termoestabilización de una proteína, típicamente mediante un incremento del número de puentes de hidrógeno (Vogt y cols., 1997), puentes salinos (Karshikoff y Ladenstein, 2001), interacciones hidrofóbicas (Goodenough y Jenkins, 1991), puentes disulfuro (Matsumura y cols., 1989) y coordinación con metales (Vieille y cols., 2001; Kataeva y cols., 2003). La estabilidad conformacional de la proteína, definida como la diferencia de energía libre ( $\Delta G$ ) entre el estado plegado y el desplegado, se encuentra en el rango de los 40 kJ.mol<sup>-1</sup>, y se ha observado que la contribución a la misma de tan sólo una de estas interacciones puede ser de hasta 25 kJ.mol<sup>-1</sup>, por lo que la introducción de tan sólo un par de estas interacciones puede incrementar significativamente la termoestabilidad de una proteína (Daniel y Cowan, 2000).

ii) Modificaciones conformacionales

El diseño de una conformación “térmicamente eficiente” es otra característica adaptativa comúnmente observada en proteínas termoestables. Las modificaciones más frecuentes son: aumento de la rigidez (Li y cols., 2005), empaquetamiento más eficiente con menor número de cavidades (Russell y cols., 1997), reducción de la entropía de desplegamiento por acortamiento de los bucles y por sustitución de aminoácidos con alta entropía conformacional por otros más rígidos (Pal y Chakrabarti, 1999; Vieille y Zeikus, 2001; Li y cols., 2005), y, finalmente, descenso de la tensión conformacional (Vieille y cols., 1996) o hélices- $\alpha$  más estables (Facchiano y cols., 1998).

### 1.4 TERMOZIMAS EN BIOCATÁLISIS

El empleo de enzimas como biocatalizadores en procesos industriales presenta ciertas ventajas sobre la química tradicional, como una alta regio- y estereoselectividad, la posibilidad de trabajar en condiciones de reacción más suaves, lo que implica una menor dependencia del empleo de solventes o reactivos contaminantes (Rozzell, 1999; Elander, 2003), y la reducción de los pasos necesarios para completar una transformación, lo que ha hecho de la búsqueda de nuevos y más eficientes biocatalizadores una prioridad en el terreno actual de la biocatálisis (Panke y cols., 2004).

A este respecto, las termozimas resultan de especial interés ya que a su termoresistencia natural, que permite el trabajo a altas temperaturas, se asocian frecuentemente una serie de ventajas adicionales:

i) Reducción de la viscosidad del medio, aumento de la solubilidad y del coeficiente de difusión de sustratos y/o productos. Como consecuencia de esto, el aumento de la biodisponibilidad de compuestos aromáticos, alifáticos y grasas insolubles, así como de polímeros insolubles como celulosa, almidón o proteínas que son difícilmente biodegradables permite su eliminación en procesos de biorremediación más eficientes (Becker y cols., 1997). Además, el incremento del coeficiente de difusión puede asociarse a un aumento de la velocidad de reacción como consecuencia de la reducción de la capa límite (Becker y cols., 1997).

ii) Purificación eficiente de termozimas cuando se expresan en un sistema mesófilo como *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*. Aprovechando la diferencia de temperatura óptima del organismo hospedador y de la fuente de la termozima, el extracto celular puede ser sometido a un tratamiento térmico que desnaturaliza la mayor parte de proteínas mesófilas, que precipitan y sedimentan por centrifugación, obteniendo un extracto enriquecido en la proteína termoestable. Este proceso se denomina desnaturalización diferencial y supone una gran ventaja del empleo de termozimas, ya que las cantidades de biocatalizador que requiere un proceso industrial puede hacer que la purificación a través de técnicas clásicas de cromatografía o precipitación con sulfato amónico no resulte rentable (Bruins y cols., 2001).

iii) Menor riesgo de contaminación del biorreactor por especies mesófilas ambientales por encima de los 60°C (Niehaus y cols., 1999; Bruins y cols., 2001).

iiii) Mayor resistencia del biocatalizador a agentes desnaturalizantes (Niehaus y cols., 1999) y solventes orgánicos (Sellek y Chaudhuri, 1999).



v) Mayor rendimiento debido a que se minimizan los subproductos de reacción, lo que permite una recuperación del producto más fácil (Watanabe, 1987).

Existen numerosos ejemplos de uso aplicado de termozimas, siendo uno de los más conocidos el de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, o Taq-polimerasa (Chien y cols., 1976; Kaledin y cols., 1980), cuyo descubrimiento supuso un salto cualitativo en la investigación científica al introducir una importante mejora en la técnica de PCR, en la que hasta entonces se empleaba el fragmento Klenow de la polimerasa de *E. coli*, que requería de la adición de nueva enzima tras cada ciclo de amplificación. También encontramos ejemplos de proteasas termoestables empleadas en productos de limpieza, aprovechando su resistencia a surfactantes y condiciones alcalinas, que provienen de microorganismos de los géneros *Pyrococcus*, *Thermococcus* o *Sulfolobus*, entre otros (Niehaus y cols., 1999). Otra de las aplicaciones más extendidas de las termozimas es la degradación de polímeros mediante el empleo de  $\alpha$ -amilasas, pululanasa, celulasas, xilanasas o quitinasas de diferentes bacterias y arqueas termófilas (Niehaus y cols., 1999; Bruins y cols., 2001; Haki y Rakshit, 2003; Atomi, 2005). A pesar de que estos son los ejemplos más prominentes del panorama actual, existen ejemplos de otras termozimas aplicadas en procesos de biocatálisis que se pueden encontrar en la amplia bibliografía dedicada al respecto.

#### **1.4.1 Mejora del biocatalizador mediante evolución dirigida**

En ocasiones, las propiedades intrínsecas de una enzima presentan alguna desventaja en términos de estabilidad o de selectividad, y es necesario modificar la proteína nativa para paliar estas carencias. Una de las técnicas de mejora enzimática que más se ha consolidado en la última década es la *Evolución Dirigida*. Este término general hace referencia a un proceso de evolución artificial en el que se generan variantes de una proteína, se aplica una presión selectiva (búsqueda de una actividad enzimática, incremento o pérdida de la función deseada, etcétera) y se seleccionan aquellos mutantes que más se adecuan a nuestro criterio de búsqueda para ser sometidos a subsiguientes ciclos de selección, de manera análoga al proceso de adaptación/selección que ocurre en la naturaleza. La figura 1.2 recoge un esquema global del concepto de Evolución dirigida, tanto *in vitro* como *in vivo*.

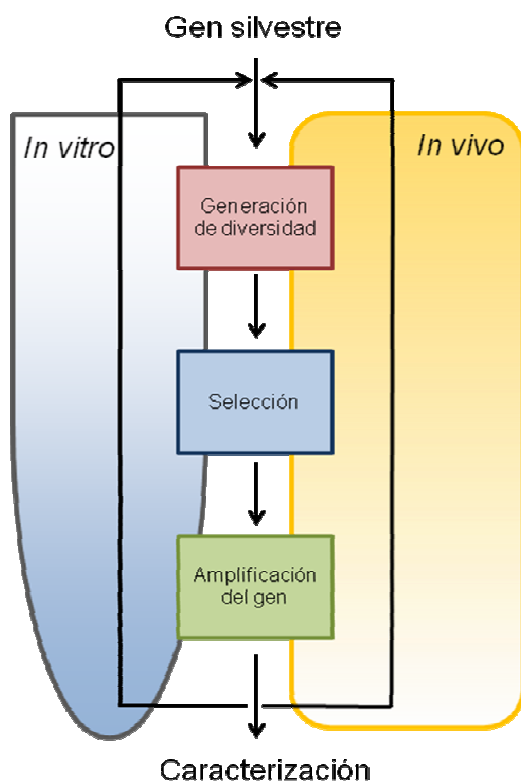


Figura 1.2 Diagrama general del proceso de evolución dirigida. Partiendo del gen que codifica la proteína silvestre, se crean variantes de éste que se seleccionarán en función de la cualidad deseada. Los clones positivos serán caracterizados o se emplearán como molde para iniciar un nuevo ciclo de variación/selección. Adaptación de Jäckel y cols. (Jäckel y cols., 2008).

Al diseñar la mejora de una proteína hay que tener en cuenta dos parámetros esenciales: el método de generación de variantes y el método de selección. La selección de uno y otro método tendrá un impacto directo en la eficiencia del proceso, en el abanico de variaciones que determinará las probabilidades de encontrar un clon positivo y en el esfuerzo requerido para llevar a cabo la criba de las variantes.

Los métodos de selección son muy variados y dependen de la propiedad que se pretenda mejorar, así como del tipo de reacción catalizada si se trata de una enzima. Así, podemos seleccionar mediante métodos colorimétricos, detección de fluorescencia, cromatografía, viabilidad celular, etcétera.

Los métodos de variación son independientes de la reacción y dependen principalmente del objetivo perseguido. A continuación se describen brevemente los principales métodos de variación, destacando las principales ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos.

#### i) *Error-prone* PCR (epPCR)

Fundamento: Amplificación del gen mediante la técnica de PCR en condiciones subóptimas, de manera que la ADN-polimerasa introduzca al azar mutaciones a lo largo de toda la secuencia (Pritchard y cols., 2005).

Ventajas: Técnica sencilla que permite trabajar sin tener información previa acerca de la estructura/función de la proteína y que tiene el potencial de introducir mutaciones en toda la proteína (Sen y cols., 2007).

Inconvenientes: Debido al carácter completamente arbitrario, posee un rendimiento muy bajo, es decir, genera una gran cantidad de mutantes silenciosos/deletéreos. Además, se ha observado cierta tendencia a introducir mutaciones preferentemente en determinadas posiciones de la secuencia (*hot-spots*), bajas probabilidades de mutar dos codones seguidos y alta tasa de introducción de codones de parada (Sen y cols., 2007).

## ii) Recombinación de ADN

Fundamento: Se basa en la combinación aleatoria de genes silvestres o de mutantes provenientes de epPCR para generar librerías combinatoriales (Stemmer, 1994).

Ventajas: No precisa trabajar con secuencias conocidas y elimina mutaciones neutras (Sen y cols., 2007).

Inconvenientes: Reducida diversidad, además de que se necesitan secuencias de tamaño mayor a 1 kb (Sen y cols., 2007).

## iii) Mutagénesis dirigida

Fundamento: Este método, a mitad de camino entre el diseño racional y la mutagénesis aleatoria, permite focalizar la región de la proteína sobre la que se genera variabilidad, reduciendo notablemente el tamaño de las librerías resultantes (Kunkel, 1985; Sayers y cols., 1992; Hogrefe y cols., 2002). El método de selección de las posiciones a mutar depende del objetivo final. Así, si se desea aumentar la termoestabilidad, puede hacerse un análisis de flexibilidad de cada aminoácido (valor-B) para identificar aquellos más flexibles y sustituirlos aleatoriamente. Si se busca un efecto sobre la especificidad/selectividad, se puede acudir a la estructura tridimensional o, en su defecto, a un modelo generado por homología. La técnica *Combinatorial Active-site Saturation Test* (CAST) desarrollada por el grupo del Prof. Reetz (Reetz y Carballeira, 2007) se basa en modificar los residuos que se engloban en una esfera de unos 10 Å de radio trazada a partir de una coordenada cero, ocupada por el ligando en el sitio de unión de la enzima. La variación se lleva a cabo mediante PCR empleando oligonucleótidos con tripletes degenerados para las posiciones seleccionadas.

Ventajas: Reduce notablemente el número de posibles variantes, centrándose en aquellos residuos cuyo papel se considera más relevante en la cualidad a mejorar (Bershtein y Tawfik, 2008) y reduciendo el esfuerzo de cribado.

Inconvenientes: Es deseable partir de una secuencia tridimensional resuelta o de un buen modelo de homología. Al centrarse en unos pocos residuos, se pueden pasar por alto mejoras introducidas por sustituciones distales o mutaciones sinérgicas (Bershtein y Tawfik, 2008).

### 1.4.2 Inmovilización del biocatalizador

La inmovilización de enzimas sobre soportes sólidos se remonta a los años 50, cuando se prepararon los primeros derivados por inclusión en matrices poliméricas (Buchholz y Kasche, 1997). Su influencia se ha extendido notablemente hasta el día de hoy, especialmente en el campo de la biocatálisis, donde se estima que un 20% de las reacciones se lleva a cabo con derivados inmovilizados (Straathof y cols., 2002). Esta técnica ofrece como ventaja principal la posibilidad de recuperar la enzima tras un ciclo de reacción para su posterior reutilización, alargando así la vida del catalizador y reduciendo costes operativos. Sin embargo, en la actualidad se conocen una serie de ventajas adicionales que justifican la inmovilización de un biocatalizador sobre un soporte sólido. Una de las ventajas más relevantes es la estabilización de la proteína como consecuencia del aumento de la rigidez de su estructura cuando se establece una unión multipuntual con el soporte (Cao, 2005). También puede asociarse a un aumento de la actividad específica (Betancor y cols., 2003), o a cambios en la selectividad, como en el caso de la lipasa de *Candida rugosa*, que en su forma soluble es (*S*)-selectiva y tras la inmovilización covalente su selectividad se invierte hacia la forma (*R*) (Palomo y cols., 2002). Otras ventajas incluyen la posibilidad de co-inmovilizar dos enzimas con actividades acopladas, aumentando la eficiencia de la catálisis por proximidad física (Sheldon, 2007). Además de enzimas purificadas, también se ha llevado a cabo la inmovilización de células enteras por diferentes métodos (Klein y Ziehr, 1990).

En la actualidad existen numerosos soportes y métodos de inmovilización que ofrecen distintas ventajas e inconvenientes, por lo que las propiedades fisicoquímicas tanto del soporte como de la enzima, así como el propósito de la inmovilización deberán tenerse en cuenta al elegir el abordaje experimental. A continuación se detallan los métodos de inmovilización más generales:

#### i) Atrapamiento (Figura 1.3A)

Fundamento: La proteína queda incluida e inmovilizada en una red polimérica (Sheldon, 2007). La matriz suele construirse a partir de derivados de silicio, como silano/alquil-silano (Reetz y Jaeger, 1998), polisiloxano/alcohol polivinílico (Santos y cols., 2008; Santos y cols., 2008) o poli(2-hidroxietilacrilato)/poli(dimetilsiloxano) (Bruns y Tiller, 2005).

Ventajas: Protege a la proteína frente a interfases gas/líquido (burbujas de aire), estrés mecánico y solventes orgánicos.

Inconvenientes: Baja carga enzimática y transferencia de masa limitada (Brady y Jordaan, 2009).

#### ii) Encapsulamiento (Figura 1.3B)

Fundamento: Similar al atrapamiento, pero en este caso el biocatalizador queda incluido en el espacio interior de una esfera hueca. Estas esferas pueden estar compuestas de de alginato, que polimeriza en presencia de  $\text{CaCl}_2$  (Zhang y cols., 2007; Zhang y cols., 2009) o más recientemente de polietilenimina (Kouisni y Rochefort, 2009).

Ventajas: Aísla y protege a la proteína del entorno.

Inconvenientes: Limitación en la transferencia de masa (Lalonde y Margolin, 2002).

#### iii) Inmovilización sobre soporte sólido (Figura 1.3C)

Fundamento: La enzima interacciona con un soporte sólido y queda inmovilizada sobre su superficie. Las interacciones enzima-soporte más comunes son la adsorción hidrofóbica e iónica (Lalonde y Margolin, 2002), y la formación de enlaces covalentes entre la  $\epsilon$ -amina de las lisinas y los grupos epóxido del soporte (Krenkova y Foret, 2004).

Ventajas: Otorga rigidez a la proteína, lo que permite su utilización en diferentes configuraciones de reactor en procesos de biocatálisis (Kunamneni y cols., 2008). Las inmovilizaciones basadas en interacciones reversibles permiten la recuperación del soporte una vez la enzima se ha desactivado completamente.

Inconvenientes: Posee baja actividad volumétrica, debido a que el soporte constituye entre el 90 y el 99% de la masa del derivado (Lalonde y Margolin, 2002; Sheldon, 2007). Además, si la interacción es reversible (es decir, no covalente), las condiciones de la reacción pueden

provocar la pérdida del biocatalizador por desorción. En el caso de la unión covalente, el soporte no puede reutilizarse una vez la enzima se ha desactivado completamente.

### iiii) Autoinmovilización (Figura 1.3D)

Fundamento: Las proteínas quedan inmovilizadas por auto-entrecruzamiento en un cristal (*Cross-linked Enzyme Crystal*, CLEC) (St. Clair y Navia, 1992) o en un agregado (*Cross-linked Enzyme Aggregate*, CLEA) (Sheldon y cols., 2005).

Ventajas: CLECs y CLEAs: Alta actividad volumétrica (el 100% de la masa del derivado inmovilizado se corresponde a la enzima). CLECs: Alta resistencia mecánica y a solventes orgánicos (Roy y Abraham, 2004), y ausencia de contaminantes al provenir de un cristal (Brady y Jordaan, 2009).

Inconvenientes: CLECs: El alto coste asociado a la necesidad de purificar y cristalizar elevadas cantidades de proteína, y que sólo es aplicable a proteínas cristalizables (Brady y cols., 2004). Este problema se puede solventar recurriendo a los CLEAs, más económicos y de aplicación más general.

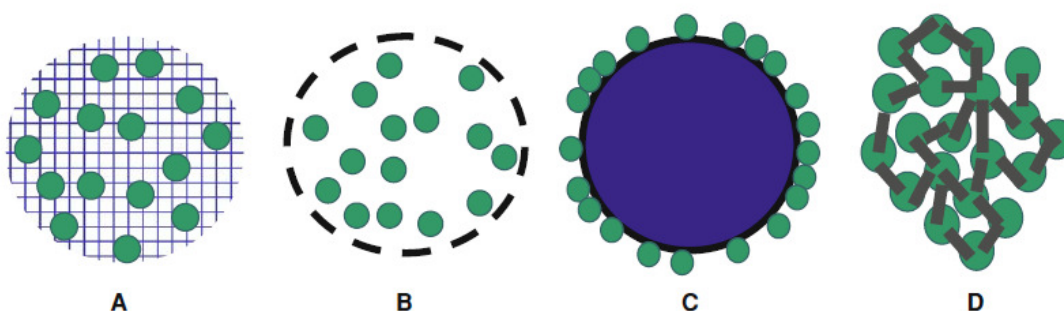


Figura 1.3 Principales métodos de inmovilización de enzimas (representadas como esferas de color verde). A) Atrapamiento; B) Encapsulación; C) Inmovilización sobre soporte sólido; D) Autoinmovilización. Original de Brady y Jordaan (Brady y Jordaan, 2009).

De manera adicional, existen otros métodos desarrollados más recientemente de inmovilización sobre membranas o nanofibras (Fang y cols., 2011).

## 1.5 NUCLEÓSIDOS: ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y APLICACIÓN

Los nucleósidos forman una familia de biomoléculas fundamentales cuya estructura básica está formada por una pentosa (ribosa o 2'-desoxirribosa) unida por un enlace N-glicosídico

a un base nitrogenada púrica o pirimidínica, y que pueden presentar diferentes grados de fosforilación (Figura 1.4). La forma monofosforilada (nucleótido monofosfato) constituye el bloque elemental con el que se construyen los ácidos nucleicos, formando cadenas unidas por enlaces fosfodiéster. Además, la forma trifosfato de la adenosina, o ATP (y en menor medida la de la guanosina, GTP), está implicada en la transferencia de energía, en la señalización celular mediada por su forma cíclica (AMPC) y en la fosforilación por quinasas, en la que actúa como donador de fosfato.

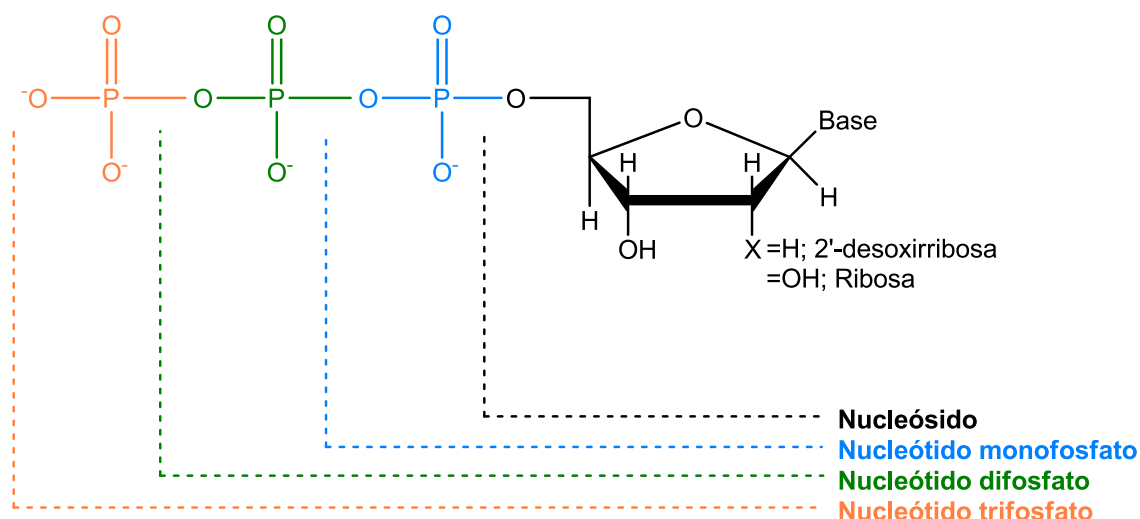


Figura 1.4 Estructura básica de un nucleósido y sus formas fosforiladas.

Los nucleósidos, y particularmente sus construcciones análogas, poseen un considerable interés práctico. En la actualidad, los fármacos derivados de nucleósidos se emplean con éxito en el tratamiento de diferentes afecciones, particularmente como agentes antitumorales (Galmarini y cols., 2002) y antivirales (Garg y cols., 1999) que se incorporan al ADN y ARN introduciendo alteraciones, o actuando como inhibidor de ADN-polimerasas, ribonucleótidos reductasas o transcriptasas reversas (Tabla 1.1). Además, este tipo de compuestos se emplean como cardioprotectores y cerebroprotectores, mediante la inhibición del transporte de nucleósidos (Saravanan y cols., 2011), en el tratamiento de procesos inflamatorios (Gregson y cols., 1999) o como supresores de la expresión génica mediada por oligonucleótidos antisentido (Fox, 2000).

**Tabla 1.1 Ejemplos de aplicación de análogos de nucleósidos en el tratamiento de tumores e infecciones virales.**

Nombre comercial	Estructura básica	Aplicación	Diana
Vidarabine	Análogo de adenosina	Antiviral - Herpesvirus	Polimerasa viral
Acyclovir	Análogo de guanosina	Antiviral - Herpesvirus	Polimerasa viral
Gancyclovir	Análogo de guanosina	Antiviral - Citomegalovirus	Polimerasa viral
Zidovudine	Análogo de timidina	Antiviral - HIV	Transcriptasa reversa
Didanosine	Análogo de inosina	Antiviral - HIV	Transcriptasa reversa
Fludarabine	Análogo de adenosina	Antitumoral - Leucemia	Incorporación al ADN
Cladribine	Análogo de adenosina	Antitumoral - Leucemia	Incorporación al ADN
Cytarabine	Análogo de citidina	Antitumoral - Leucemia	ADN polimerasa
Gemcitabine	Análogo de citidina	Antitumoral - Páncreas, mama, pulmón y ovarios	Ribonucleótido reductasa
Floxuridine	Análogo de uridina	Antitumoral - Colorrectal, páncreas, mama, y otros tumores sólidos	Timidilato sintasa

Debido a que abordan problemas sanitarios de gran impacto social, los análogos de los nucleósidos constituyen una familia de moléculas de gran interés para la biocatálisis. La disponibilidad de métodos enzimáticos eficientes de síntesis y modificación de estos compuestos permitirá minimizar el impacto medioambiental asociado a su producción y reducirá el coste económico de los mismos, lo que los hará más accesibles a la población.

### 1.5.1 Modificación enzimática

Una de las estrategias abordadas en la síntesis de nucleósidos es la modificación enzimática de una estructura nucleosídica preexistente (Condezo y *cols.*, 2006). Se puede establecer una clasificación de las enzimas empleadas para tal fin atendiendo al componente de la molécula sobre el que ocurre la modificación:

#### i) Enzimas que modifican la base nitrogenada

La enzima más representativa de este grupo es la adenosín deaminasa (ADA, EC 3.5.4.4), que lleva a cabo la desaminación hidrolítica de la posición 6 del heterociclo de adenina en la síntesis de determinados compuestos antivirales (Driscoll y *cols.*, 1996; Santaniello y *cols.*, 2005). Asimismo, la enzima adenilato deaminasa (AMPDA, EC 3.5.4.6), que lleva a cabo la misma reacción, pero sobre la forma monofosfato de la adenosina, se ha empleado para la síntesis de análogos de 6-oxopurina (Margolin y *cols.*, 1994; Santaniello y *cols.*, 2005).



## ii) Enzimas que modifican la pentosa

La modificación enzimática más frecuente de la pentosa es la acilación de los grupos hidroxilo mediante lipasas o proteasas. Las lipasas de *Pseudomonas cepacia* y *Candida antarctica* se han utilizado en la acilación regioselectiva de los carbonos 3' y 5', respectivamente, empleando como donadores ésteres y carbonatos de oximas (Moris y Gotor, 1992; Moris y Gotor, 1993; García y cols., 2004; Simeo y cols., 2009). Este tipo de modificación también se ha llevado a cabo con proteasas como la subtilisina, si bien las productividades que se obtienen con éstas son menores que con lipasas (Condezo y cols., 2006).

Otra modificación interesante es la oxidación selectiva en la posición 5' empleando enzimas como la nucleósido oxidasa de *Stenotrophomonas maltophila* (Ferrero y Gotor, 2000). Los derivados obtenidos en dicha reacción sirven como precursor en la síntesis de diferentes nucleósidos con propiedades antiinflamatorias (Mahmoudian y cols., 1998).

### 1.5.2 Síntesis combinatorial

Otra estrategia abordada en la síntesis de nucleósidos es la combinación de bases nitrogenadas y pentosas con diferentes grados de modificación para generar bibliotecas combinatoriales de análogos. Se han descrito dos actividades enzimáticas capaces de llevar a cabo la transglicosilación selectiva de nucleósidos.

#### 1.5.2.1 Nucleósido-desoxirribosiltransferasas

Las nucleósido-desoxirribosiltransferasas, o NdRTs (EC 2.4.2.6), forman una familia de enzimas que llevan a cabo la transglicosilación directa de un residuo de pentosa entre un nucleósido donador y una base nitrogenada aceptora (Figura 1.5). Esta enzima fue descrita por primera vez por MacNutt en *Lactobacillus helveticus* (Macnutt, 1952) y posteriormente en otras especies del mismo género, como *L. leichmanii* (Beck y Levin, 1963) y *L. reuterii* (Fernandez-Lucas y cols., 2010), por lo que se trata de una enzima poco extendida en la filogenia. Todas las enzimas pertenecientes a esta familia exhiben una especificidad estricta hacia 2'-desoxirribosa, si bien se han observado diferencias en las especificidades hacia la base nitrogenada entre las enzimas aisladas hasta la fecha, lo que ha permitido su clasificación en dos grupos:

i) Grupo I: Transfieren específicamente residuos de 2'-desoxirribosa desde un nucleósido de purina hasta una base aceptora de purina (Kaminski, 2002).

ii) Grupo II: Transfieren un residuo de 2'-desoxirribosa indistintamente entre purinas y pirimidinas (Holguin y Cardinaud, 1975). Las enzimas pertenecientes a este grupo pueden llevar a cabo la transglicosilación entre nucleósidos y bases de citosina, a diferencia de la transglicosilación mediada por nucleósido fosforilasas (ver más adelante).

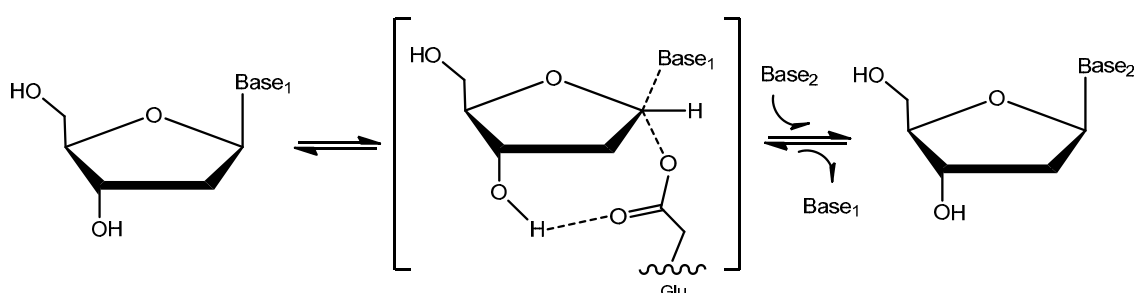


Figura 1.5 Mecanismo catalítico propuesto por Anand y cols. (Anand y cols., 2004) de la nucleósido-desoxirribosiltransferasa, que implica la unión covalente entre un glutámico y el hidroxilo en 3' de la 2'-desoxirribosa.

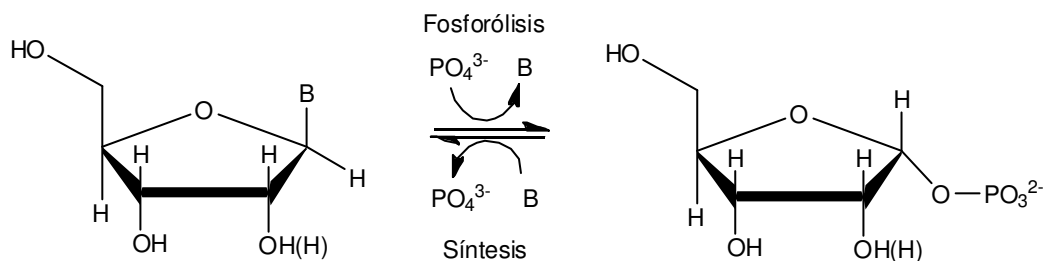
A pesar de las restricciones de especificidad de la pentosa que impone este tipo de enzimas, poseen flexibilidad en el reconocimiento de la base nitrogenada, por lo que se han empleado como biocatalizador en la síntesis de diferentes análogos (Holguin-Hueso y Cardinaud, 1972; Huang y cols., 1983; Betbeder y cols., 1989; Pochet y cols., 1995; Fernandez-Lucas y cols., 2007; Kaminski y cols., 2008).

#### 1.5.2.2 Nucleósido fosforilasas

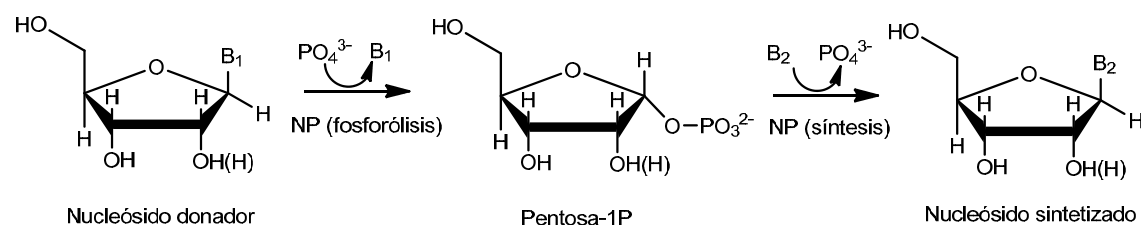
La familia de las nucleósido fosforilasas (NPs) agrupa una serie de actividades enzimáticas implicadas en la vía de rescate de nucleósidos de purina y pirimidina y catalizan la fosforólisis reversible e independiente de ATP de nucleósidos (Figura 1.6A). Estas enzimas fueron descubiertas en 1911 (Levene y Medigreceanu, 1911) y, al contrario que las NdRTs, se han descrito a lo largo de toda la filogenia. La transglicosilación mediada por NPs transcurre mediante un mecanismo acoplado donde el nucleósido es fosforilado, lo que libera una pentosa-1P que actúa como sustrato en la subsiguiente reacción sintética (Figura 1.6B). Estas enzimas presentan una amplia diversidad de estructuras y especificidades de sustrato, aunque, como norma general,

todas aceptan tanto ribosa como 2'-desoxirribosa. Sin embargo, y a diferencia de las NdRTs, ninguna NP descrita hasta la fecha reconoce nucleósidos de citosina.

## A



## B



**Figura 1.6** A) Esquema de la reacción catalizada por las nucleósido fosforilasas indicando la vía fosforolítica y la vía sintética. B) Transglucosilación acoplada de nucleósidos mediada por nucleósido fosforilasas. 2' = OH: ribosa; 2' = H: 2'-desoxirribosa; B<sub>(x)</sub> = base nitrogenada.

Algunos autores han realizado clasificaciones de las NPs basadas en diferentes parámetros, de las cuales, la más aceptada es la propuesta por Pugmire y Ealick (Pugmire y Ealick, 2002), elaborada a partir de análisis estructurales:

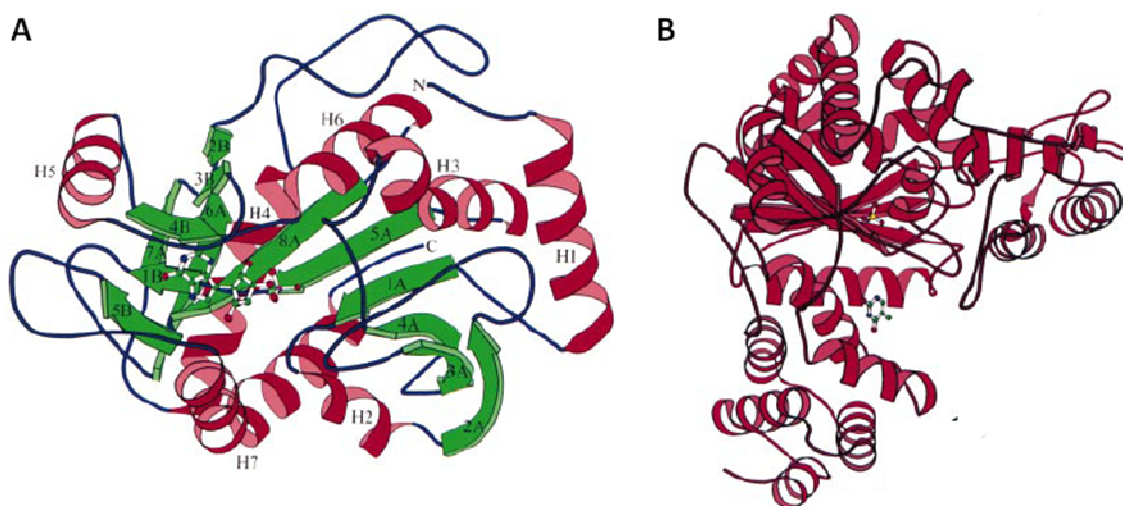
### i) NP tipo-I

Las NPs tipo-I se caracterizan por presentar una estructura común constituida por un barril- $\beta$  distorsionado en posición central rodeado de hélices- $\alpha$  (Figura 1.7A). Este tipo incluye a las purín-nucleósido fosforilasas (PNPs, EC 2.4.2.1), específicas de purinas, y a las uridín fosforilasas (UPs, EC 2.4.2.3), específicas de uridina y 2'-desoxiuridina. Las configuraciones oligoméricas más comunes observadas en estas enzimas son: a) PNPs homotriméricas específicas de 6-oxopurinas (guanina e hipoxantina); b) PNPs homohexaméricas que aceptan tanto 6-aminopurinas (adenina) como 6-oxopurinas; c) UPs homohexaméricas. No obstante, estas clasificaciones son tentativas, ya que se conocen varios ejemplos de NPs tipo-I que escapan a esta norma (Bzowska y cols., 2000); además, en este grupo se incluyen también enzimas como las antranilato fosforribosiltransferasas (EC 2.4.2.18) y las 5'-desoxi-5'-metiltioadenosina fosforilasas

(EC 2.4.2.28), que, aunque no poseen actividad NPasa, presentan similitud estructural con éstas (Pugmire y Ealick, 2002).

## ii) NP tipo-II

Este grupo está comprendido por homodímeros en los que cada monómero se configura en un dominio  $\alpha/\beta$  y un dominio  $\alpha$ , separados por una hendidura constituida por tres bucles (Figura 1.7B). Todas las NPs incluidas en este tipo son específicas de pirimidinas, y se dividen en uridín fosforilasas (UPs, EC 2.4.2.3), timidín fosforilasas (TPs EC 2.4.2.4) y pirimidín-nucleósido fosforilasas (PyNPs, EC 2.4.2.2), que reconocen indistintamente uracilo y timina, y que se han descrito en algunas especies de bacterias.



**Figura 1.7** Estructura monomérica básica de A) NPs tipo-I, compuesta de un barril- $\beta$  distorsionado central y hélices- $\alpha$  periféricas y B) NPs tipo-II, distinguiéndose en la parte superior un dominio  $\alpha/\beta$  y en la parte inferior un dominio compuesto exclusivamente por hélices- $\alpha$ . Original de Pugmire y Ealick (Pugmire y Ealick, 2002).

Debido a la amplia diversidad de especificidad de sustrato observada en este tipo de enzimas y al carácter reversible de su mecanismo catalítico, que permite acoplar la actividad de dos NPs diferentes en una misma reacción, estas enzimas se han empleado extensivamente como biocatalizadores en la síntesis de nucleósidos, tanto en su forma purificada como sobreexpresadas en células enteras (Mikhailopulo, 2007). Hasta el momento, la práctica totalidad de las NPs aplicadas a procesos de biosíntesis provienen de microorganismos mesófilos como *E. coli* (Krenitsky y cols., 1981; Trelles y cols., 2004) o *B. subtilis* (Condezo y cols., 2006). La aplicación de NPs de microorganismos termófilos como biocatalizadores es un terreno apenas explorado, habiéndose descrito hasta la fecha únicamente para las NPs de *Geobacillus stearothermophilus* (Hori y cols., 1991; Taran y cols., 2009).

Por todo lo expuesto, consideramos que la identificación y caracterización de nuevas enzimas de origen termófilo que permitan enriquecer el abanico de herramientas disponibles para la síntesis de nucleósidos con propiedades terapéuticas era una materia de interés para su investigación.



## **OBJETIVOS**

---





## 2 OBJETIVOS

La filosofía de la *Química Sostenible* tiene como principio la minimización del impacto medioambiental como consecuencia de los procesos de síntesis química industrial, asociados al desarrollo humano, mediante la reducción de reactivos o disolventes contaminantes en favor de materiales más ecológicos y el empleo de condiciones de reacción más suaves. En este contexto, el empleo de enzimas como catalizadores de procesos de síntesis en sustitución total o parcial de un proceso de síntesis química tradicional tiene varias ventajas asociadas, principalmente su regio- y estereoespecificidad que resulta en procesos más eficientes y la posibilidad de trabajar en condiciones de reacción suaves y empleando medios acuosos.

En los últimos años se está produciendo un incremento del protagonismo de las enzimas aisladas de microorganismos termófilos, ya que a las ventajas propias de una enzima como biocatalizador se añade una mayor resistencia a condiciones agresivas, menor probabilidad de contaminación del reactor y procesos más económicos de purificación.

Por todo lo expuesto, hemos planteado los siguientes objetivos en el presente trabajo:

1. Identificar microorganismos termófilos con actividades de posible aplicación industrial.
2. Identificar, purificar y caracterizar las enzimas responsables de la actividad observada.
3. Aplicar las actividades enzimáticas purificadas en la síntesis de compuestos de alto valor añadido.
4. Adecuar las enzimas para su aplicación mediante inmovilización en soporte sólido, y mejora de cualidades de interés mediante evolución dirigida.







### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

##### 3.1.1 Cepas

**Tabla 3.1 Cepas empleadas en este trabajo**

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>hsdS gal (λcl<sup>ts</sup>857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 Gene1)</i>	(Rosenberg y cols., 1987)
<i>T. thermophilus</i> HB27	Cepa silvestre	
<i>T. thermophilus</i> NAR1	Cepa silvestre. Operón <i>narCGHJIKT</i>	(Cava y cols., 2007)
<i>T. thermophilus</i> PRQ25	Cepa silvestre	Cedida por el Dr. Da Costa (Manaia y cols., 1994)
<i>T. thermophilus</i> PRQ16	Cepa silvestre	Cedida por el Dr. Da Costa (Manaia y cols., 1994)
<i>T. thermophilus</i> B	Cepa silvestre	Cedida por el Dr. Da Costa
<i>T. thermophilus</i> RQ1	Cepa silvestre	Cedida por el Dr. Da Costa
<i>T. thermophilus</i> VG7	Cepa silvestre	Cedida por el Dr. Da Costa
<i>T. thermophilus</i> FIJ13A1	Cepa silvestre	Cedida por el Dr. Da Costa
<i>T. thermophilus</i> NR17	Cepa silvestre	Cedida por el Dr. Da Costa
<i>T. thermophilus</i> HN1.11	Cepa silvestre	Cedida por el Dr. Da Costa
<i>T. thermophilus</i> CC16	Cepa silvestre	Cedida por el Dr. Da Costa

##### 3.1.2 Plásmidos

**Tabla 3.2 Plásmidos empleados en este trabajo**

Nombre	Descripción	Referencia
pGEM-T	Vector de clonaje. Amp <sup>r</sup> , plac-lacZ' Promotores T7 y Sp6. T en 3' que facilita la ligación con productos de PCR mediante polimerasas que introducen una adenina final	Promega
pET-22b(+)	Vector de expresión. Amp <sup>r</sup> . Expresión regulada bajo promotor T7. Cola de 6 histidinas en C-terminal opcional	Novagen

### 3.1.3 Plásmidos contruidos

**Tabla 3.3 Plásmidos contruidos en este trabajo**

Nombre	Descripción
pGEM-T-TTC0188	Fusión entre pGEM-T y el gen TTC0188 de <i>T. thermophilus</i> HB27 por unión entre una T terminal en 3' del plásmido y una A que introduce la polimerasa Tth en 3' en el producto de PCR
pGEM-T-TTC0194	Fusión entre pGEM-T y el gen TTC0194 de <i>T. thermophilus</i> HB27 por unión entre una T terminal en 3' del plásmido y una A que introduce la polimerasa Tth en 3' en el producto de PCR
pGEM-T-TTC1070	Fusión entre pGEM-T y el gen TTC1070 de <i>T. thermophilus</i> HB27 por unión entre una T terminal en 3' del plásmido y una A que introduce la polimerasa Tth en 3' en el producto de PCR
pGEM-T-TTC1412	Fusión entre pGEM-T y el gen TTC1412 de <i>T. thermophilus</i> HB27 por unión entre una T terminal en 3' del plásmido y una A que introduce la polimerasa Tth en 3' en el producto de PCR
pGEM-T-TTC1491	Fusión entre pGEM-T y el gen TTC1491 de <i>T. thermophilus</i> HB27 por unión entre una T terminal en 3' del plásmido y una A que introduce la polimerasa Tth en 3' en el producto de PCR
pET22b-TTC0188	Fusión entre pET22b y el gen TTC0188 en los sitios NdeI/EcoRI
pET22b-TTC0194	Fusión entre pET22b y el gen TTC0194 en los sitios NdeI/EcoRI
pET22b-TTC1070	Fusión entre pET22b y el gen TTC1070 en los sitios NdeI/EcoRI
pET22b-TTC1412	Fusión entre pET22b y el gen TTC1412 en los sitios NdeI/EcoRI
pET22b-TTC1491	Fusión entre pET22b y el gen TTC1491 en los sitios NdeI/EcoRI
pET22b-M62	Derivado de la construcción pET22b-TTC1412 con un codón degenerado tipo NNK sustituyendo al que codifica el aminoácido M62
pET22b-H81	Derivado de la construcción pET22b-TTC1412 con un codón degenerado tipo NNK sustituyendo al que codifica el aminoácido H81
pET22b-L113	Derivado de la construcción pET22b-TTC1412 con un codón degenerado tipo NNK sustituyendo al que codifica el aminoácido L113
pET22b-H115	Derivado de la construcción pET22b-TTC1412 con un codón degenerado tipo NNK sustituyendo al que codifica el aminoácido H115
pET22b-T116	Derivado de la construcción pET22b-TTC1412 con un codón degenerado tipo NNK sustituyendo al que codifica el aminoácido T116
pET22b-Y164	Derivado de la construcción pET22b-TTC1412 con un codón degenerado tipo NNK sustituyendo al que codifica el aminoácido Y164
pET22b-D168	Derivado de la construcción pET22b-TTC1412 con un codón degenerado tipo NNK sustituyendo al que codifica el aminoácido D168
pET22b-V173	Derivado de la construcción pET22b-TTC1412 con un codón degenerado tipo NNK sustituyendo al que codifica el aminoácido V173
pET22b-I179	Derivado de la construcción pET22b-TTC1412 con un codón degenerado tipo NNK sustituyendo al que codifica el aminoácido I179

pET22b-E174	Derivado de la construcción pET22b-TTC1412 con un codón degenerado tipo NNK sustituyendo al que codifica el aminoácido E174
pET22b-F206	Derivado de la construcción pET22b-TTC1412 con un codón degenerado tipo NNK sustituyendo al que codifica el aminoácido F206
pET22b-K306	Derivado de la construcción pET22b-TTC1412 con un codón degenerado tipo NNK sustituyendo al que codifica el aminoácido K306

### 3.1.4 Oligonucleótidos

**Tabla 3.4 Oligonucleótidos empleados en este trabajo. Los nucleótidos subrayados se corresponden a las dianas de restricción añadidas para el clonaje (NdeI: CATATG; EcoRI: GAATTC). Los nucleótidos en cursiva añaden un espacio físico que facilite la posterior digestión mediante restrictasas. N= A, T, C, G; K= T, G; M= A, C**

Nombre	Secuencia 5'-3'	Descripción
TTC0188F	<i>TTC</i> <u>CATATG</u> GTGTGGCTCCTCTTCCCCCA	Empleado en la clonación de TTC0188
TTC0188R	<i>TTC</i> <u>GAATT</u> CTCAGCCGGGGGGCCTACG	Empleado en la clonación de TTC0188
TTC0194F	<i>TTC</i> <u>CATATG</u> ATGCCGATATGGAGCTC	Empleado en la clonación de TTC0194
TTC0194R	<i>TTC</i> <u>GAATT</u> CTCAGAGCTCGGCGAGGAT	Empleado en la clonación de TTC0194
TTC1070F	<i>TTC</i> <u>CATATG</u> ATGAGCCCCATCCACGTG	Empleado en la clonación de TTC1070
TTC1070R	<i>TTC</i> <u>GAATT</u> CTCAAACCTCCAGGACGGC	Empleado en la clonación de TTC1070
TTC1412F	<i>TTC</i> <u>CATATG</u> ATGAACCCGTGGTCTTCATCCGGGA	Empleado en la clonación de TTC1412
TTC1412R	<i>TTC</i> <u>GAATT</u> CTAGATGGCCTCCAGGACCAAGGG	Empleado en la clonación de TTC1412
TTC1491F	<i>TTC</i> <u>CATATG</u> ATGGACGCGGTGAAGAAGGCCA	Empleado en la clonación de TTC1491
TTC1491R	<i>TTC</i> <u>GAATT</u> CTAGGCCCTGAGAAAGGCCACG	Empleado en la clonación de TTC1491
M62F	TGGCTCACCGAAACCNKGCCGCTCGGGGAAG	Empleado en la construcción de pET22b-M62
M62R	CTTCCCCGAGCGGGCMNNGGTTTCGGTGAGCCA	Empleado en la construcción de pET22b-M62
H81F	CACCCCGTGGACAAGNNKTCCTCGGGGGGCGTG	Empleado en la construcción de pET22b-H81
H81R	CACGCCCCCGAGGAMNNCTGTCCACGGGGTG	Empleado en la construcción de pET22b-H81
L113F	ATGTCGGGCCGGGGCCKGCCCCACCGGGGGG	Empleado en la construcción de pET22b-L113
L113R	CCCCCGGTGTGGGCMNNGCCCCGCCCCGACAT	Empleado en la construcción de pET22b-L113
H115F	GGCCGGGGCCTGGCCNNKACCGGGGGGACCATA	Empleado en la construcción de pET22b-H115
H115R	TATGGTCCCCCGGTMNNGGCCAGGCCCGGCC	Empleado en la construcción de pET22b-H115
T116F	CGGGGCCTGGCCACNNKGGGGGGACCATAGAC	Empleado en la construcción de pET22b-T116
T116R	GTCTATGGTCCCCCMNNGTGGGCCAGGCCCG	Empleado en la construcción de pET22b-T116
Y164F	GATGGGAAGCTTNKGCCTCCGCGAC	Empleado en la construcción de pET22b-Y164
Y164R	GTCGCGGAGGGCMNNAAGCTTCCCATC	Empleado en la construcción de pET22b-Y164
D168F	CTTTACGCCCTCCGCNNKGTGACCGCCACGGTG	Empleado en la construcción de pET22b-D168
D168R	CACCGTGGCGGTACMNNGCGGAGGGCGTAAAG	Empleado en la construcción de pET22b-D168

V173F	GACGTGACCGCCACGNNKGAGAGCGTGCCTTTG	Empleado en la construcción de pET22b-V173
V173R	CAAAGGCACGCTCTCMNNCGTGGCGGTACGTC	Empleado en la construcción de pET22b-V173
E174F	GTGACCGCCACGGTGNNKAGCGTGCCTTTGATC	Empleado en la construcción de pET22b-E174
E174R	GATCAAAGGCACGCTMNNCACCGTGGCGGTAC	Empleado en la construcción de pET22b-E174
I179F	GAGAGCGTGCCTTTGNNKGCAGCTCCATCATG	Empleado en la construcción de pET22b-I179
I179R	CATGATGGAGCTCGCMNNCAAAGGCACGCTCTC	Empleado en la construcción de pET22b-I179
F206F	GTGGGCCGGGGGCCNNKATGAAGACCCTGGAG	Empleado en la construcción de pET22b-F206
F206R	CTCCAGGGTCTTCATMNNGGCCCCCGGCCAC	Empleado en la construcción de pET22b-F206
K360F	GGGGGGCGGAAGCGGNNKGGGGAGCCATTGAC	Empleado en la construcción de pET22b-K360
K360R	GTCAATGGGCTCCCMNNCCGCTTCCGCCCCC	Empleado en la construcción de pET22b-K360
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Secuenciación de pET22b y sus derivados
T7term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	Secuenciación de pET22b y sus derivados

## 3.2 MATERIAL QUÍMICO Y BIOLÓGICO

### 3.2.1 Medios de cultivo

**Tabla 3.5 Medios de cultivo líquido empleados en el crecimiento y selección de microorganismos. Los medios sólidos se obtuvieron añadiendo agar 1,5% (p/v) antes de la esterilización**

Nombre	Composición	Referencia
TB	Bacto-triptona 8 g.L <sup>-1</sup> , extracto de levadura 4 g.L <sup>-1</sup> , NaCl 3 g.L <sup>-1</sup> , pH=7,5	(Ramirez-Arcos y cols., 1998)
LB	Bacto-triptona 10 g.L <sup>-1</sup> , extracto de levadura 5 g.L <sup>-1</sup> , NaCl 5 g.L <sup>-1</sup> , pH=7	(Lennox, 1955)
LB <sub>A100</sub>	Bacto-triptona 10 g.L <sup>-1</sup> , extracto de levadura 5 g.L <sup>-1</sup> , NaCl 5 g.L <sup>-1</sup> , pH=7, ampicilina 100 µg.ml <sup>-1</sup>	
LB <sub>CB100</sub>	Bacto-triptona 10 g.L <sup>-1</sup> , extracto de levadura 5 g.L <sup>-1</sup> , NaCl 5 g.L <sup>-1</sup> , pH=7, carbenicilina 100 µg.ml <sup>-1</sup>	
M9	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 42 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 22 mM, NaCl 8,5 mM, NH <sub>4</sub> Cl 18,7 mM, MgSO <sub>4</sub> 1 mM, CaCl <sub>2</sub> 0,1 mM, glucosa 0,2 %, tiamina 0.5 µg.ml <sup>-1</sup> , pH=7,5	(Sambrook y cols., 1989)
M9 <sub>A100</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 42 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 22 mM, NaCl 8,5 mM, NH <sub>4</sub> Cl 18,7 mM, MgSO <sub>4</sub> 1 mM, CaCl <sub>2</sub> 0,1 mM, glucosa 0,2 %, tiamina 0.5 µg.ml <sup>-1</sup> , pH=7,5, ampicilina 100 µg.ml <sup>-1</sup>	
SOC	Bacto-triptona 20 g.L <sup>-1</sup> , extracto de levadura 5 g.L <sup>-1</sup> , NaCl 0,5 g.L <sup>-1</sup> , KCl 0,2 g.L <sup>-1</sup> , MgCl <sub>2</sub> 10 mM, MgSO <sub>4</sub> 20 mM, Glucosa 0,3 % (p/v)	(Hanahan, 1983)



### 3.2.2 Soluciones y tampones

**Tabla 3.6 Soluciones y tampones generales empleados en el transcurso del trabajo**

Nombre	Composición	Función
Tampón de electroforesis 5x	Tris-HCl 125 mM pH=8,8, glicina 1 M, SDS 20 mM	SDS-PAGE: tampón de electroforesis
Tampón de carga Laemmli 5x	Tris-HCl 300 mM pH=6,8, SDS 5 % (p/v), $\beta$ -mercaptoetanol 10 % (v/v), glicerol 50 % (v/v), azul de bromofenol 0,002 % (p/v), EDTA 25 mM	SDS-PAGE: Preparación de muestras de proteínas
Solución de tinción de proteínas	Coomassie R250 0,1 % (p/v), ácido acético glacial 10 % (v/v), metanol 20 % (v/v)	SDS-PAGE: tinción de proteínas
Solución de destinción de proteínas	Ácido acético glacial 10 % (v/v), metanol 40 % (v/v)	SDS-PAGE: destinción de proteínas
Tampón TAE 1x	Tris-acetato 40 mM pH=8,0, EDTA 1 mM	Electroforesis de ADN: preparación de geles de agarosa y electroforesis
Tampón de carga de DNA 10X	TAE 10X, glicerol 30 % (v/v), azul de bromofenol 0,25 % (p/v), cianol de xileno FF 0,25 % (p/v)	Electroforesis de ADN: Preparación de muestras
Solución I de minipreps	Tris-HCl 25 mM pH=7,5, Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM	Purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina: resuspensión de células
Solución II de minipreps	NaOH 0,2 M, SDS 1 % (p/v)	Purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina: lisis celular
Solución III de minipreps	Acetato potásico 3 M, ácido acético glacial 0,5 M	Purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina: precipitación de ADN
TE 1x	Tris-HCl 10 mM pH=8,0, EDTA 1 mM.	Preparación de ADN cromosómico de <i>T. thermophilus</i>

### 3.2.3 Nucleósidos y bases nitrogenadas

Todos los sustratos fueron adquiridos a Sigma, a excepción de Aciclovir (Biosynthèse), *ara*-A (Laboratorios CINFA S.A.) y benzimidazol (Fluka)

### 3.3 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

#### 3.3.1 Crecimiento y conservación de las cepas

Todas las cepas de *T. thermophilus* fueron cultivadas a 65°C y 150 rpm en medio líquido, siendo el volumen máximo 1/5 de la capacidad del recipiente. Dado que el medio TB puede resultar tóxico para las células debido a su elevado contenido en sales, se realizó un cultivo inicial en medio TB y en TB diluido a la mitad en m<sub>q</sub>H<sub>2</sub>O, dejando crecer las células hasta alcanzar la fase estacionaria y midiendo la DO<sub>600</sub> de una muestra del cultivo como estimación de la población celular. Las cepas HB27, NAR1, B y RQ1 mostraron mejor crecimiento cuando se cultivaron en medio TB, mientras que las cepas PRQ16, PRQ25, N17, FIJ13A1, VG7, HN1.11 y CC16 crecieron mejor en TB diluido al doble, de modo que en los subsiguientes experimentos se emplearon los medios óptimos para cada cepa.

El crecimiento en medio líquido de *E. coli* se realizó a 37°C y 150 rpm en recipientes conteniendo el medio apropiado.

Todas las cepas se conservaron en glicerol 15% (v/v) a -80°C. Para la revitalización de las cepas, se tomó una pequeña muestra sólida del criotubo, se disolvió en 2 mL de medio líquido y se incubó a la temperatura adecuada y en agitación durante toda la noche. Al día siguiente se añadió un volumen 1/100 del preinóculo en un matraz conteniendo el volumen adecuado y se cultivó en las mismas condiciones.

El crecimiento en placa se realizó a 37°C en el caso de *E. coli* y 65°C en el caso de *T. thermophilus*, siendo necesario para este último una atmósfera húmeda a fin de evitar la deshidratación del medio sólido. Las placas se conservaron a 4°C durante un máximo de un mes.

#### 3.3.2 Transformación de *E. coli*

##### 3.3.2.1 Choque térmico

Las células competentes de *E. coli* se prepararon según el método descrito por Inoue (Inoue y cols., 1990) y se conservaron en alícuotas de 50 µl en tubos de 1,5 mL a -80°C.

La transformación se realizó siguiendo una modificación del método descrito por Inoue (Inoue y cols., 1990). Se tomó una alícuota de células competentes, manteniéndola en todo momento a 4°C, y se añadió el ADN purificado en un volumen no superior al 5% del total. Se mantuvieron las células a 4°C durante 30 minutos y a continuación se introdujeron en un baño con agua a 42°C, sin agitación, durante 15 segundos, transfiriéndose inmediatamente a 4°C. A

continuación se añadieron 800  $\mu$ L de medio LB a las células, se mezclaron suavemente por inversión, y se incubaron a 37°C y 150 rpm durante una hora para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico. Transcurrido el tiempo, se pipetearon distintos volúmenes en placas conteniendo el antibiótico de selección adecuado, añadiendo esferas de vidrio para la correcta dispersión del líquido sobre la superficie. Tras retirar las esferas, las placas se incubaron en las condiciones necesarias.

### 3.3.2.2 Electroporación

La electroporación fue el método preferente para la transformación en *E. coli* de las librerías de mutantes de TTC1412 generadas por ISM, donde la eficiencia de transformación es un parámetro crítico en el procedimiento experimental.

La preparación de células electrocompetentes se realizó de acuerdo con el método propuesto por el fabricante del electroporador (Micropulser, BioRad). Para ello, se centrifugó un cultivo de 500 mL en LB cuando alcanzó una  $DO_{600} = 0,5-0,7$ . (Nota: a partir de este momento, todo el proceso se realizó lo más cerca posible de 0°C) Las células se resuspendieron suavemente en 500 mL de glicerol 10% (p/v), y se centrifugaron a 4.000 x g durante 15 minutos. Se repitió el proceso con 250, 20 y 1 mL de glicerol 10% y se distribuyó el volumen final en alícuotas de 50  $\mu$ L para su conservación a -80°C.

La transformación se realizó añadiendo ADN purificado y desalado a 50  $\mu$ L de células electrocompetentes, manteniendo la mezcla a 4°C durante 30 minutos, tras lo cual se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm previamente enfriada. El programa de electroporación se eligió siguiendo las indicaciones del fabricante, evitando pulsos de más de 5 ms. Tiempos más largos indican una elevada concentración de sales en la muestra y producen daños en las células, reduciéndose dramáticamente la eficiencia de transformación. Inmediatamente tras el pulso, se añadieron 800  $\mu$ L de medio SOC atemperado a las células, se transfirieron a tubos de 1,5 mL y se cultivaron a 37°C durante una hora para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico. Transcurrido este tiempo, y con la ayuda de un asa de vidrio estéril, las células se extendieron sobre placas de medio sólido conteniendo el antibiótico de selección necesario, y se incubaron en las condiciones adecuadas.

### 3.4 MANIPULACIÓN DEL ADN

#### 3.4.1 Preparación de ADN plasmídico de *E. coli*

El ADN plasmídico de *E. coli* se extrajo de cultivos en medio líquido en fase estacionaria siguiendo el método de la lisis alcalina (Sambrook y cols., 1989), o bien empleando el kit comercial Wizard Plus SV Minipreps (Promega) o QIAprep Lyseblue (QIAgen) siguiendo el método descrito por los fabricantes. EL ADN obtenido se evaluó por espectrofotometría (NanoDrop ND-1000, Thermo).

#### 3.4.2 Preparación de ADN cromosómico de *T. thermophilus* HB27

El ADN cromosómico de *T. thermophilus* HB27 se obtuvo de cultivos en medio líquido en fase estacionaria, siguiendo el protocolo descrito por Marmur (Marmur, 1961). Las células de un cultivo de 2-10 mL se centrifugaron y lavaron en tampón Tris-HCl 50 mM pH= 7,5, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM y se resuspendieron en 50 µl de tampón Tris-HCl 25 mM pH= 7,5, glucosa 50 mM, EDTA 5mM, RNasa A 0,1 mg.ml<sup>-1</sup> (Roche) y lisozima 0,1 mg.ml<sup>-1</sup> (Roche, en EDTA 0,25 M). Las células se dejaron incubar 1 hora a 37°C, tras lo cual se incrementó el volumen TE 1X y se añadió sarkosil 0,5% (Sigma) y pronasa E 0,1 mg.ml<sup>-1</sup> (Merck) a 56°C durante 1 hora para el lisado, seguido de un tratamiento con proteinasa K 3 mg.ml<sup>-1</sup> (Sigma) a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras se sometieron a ciclos alternos de congelación/descongelación mediante introducción en nieve carbónica (-70°C) e inmersión en baño de agua (40°C), seguidos de agitación vigorosa y varias extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1 v/v/v) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v). El DNA obtenido se precipitó con dos volúmenes de etanol puro (Merck) o 0,7 volúmenes de isopropanol (Merck) y acetato de amonio pH= 5,0 a 100 mM (concentración final), y finalmente se resuspendió en 20 µl de agua Mili-Q. Este protocolo permite obtener fragmentos de DNA cromosómico con un tamaño medio de 25 kpb, que pueden emplearse para la amplificación de genes de *T. thermophilus* HB27 mediante la técnica de PCR.

#### 3.4.3 Amplificación y clonación del ADN

##### 3.4.3.1 Clonación de genes del cromosoma de *T. Thermophilus* HB27

La clonación de genes cromosómicos de *T. thermophilus* HB27 en el sistema heterólogo de expresión *E. coli* BL21(DE3) constó de tres pasos: amplificación del fragmento de interés, subclonaje en pGEM-T y clonaje en el vector de expresión pET22b(+).

La amplificación de los genes de interés de *T. thermophilus* HB27 se llevó a cabo mediante la técnica de PCR, empleando un termociclador iCycler (BioRad), en las condiciones descritas en la tabla 3.7, y utilizando el siguiente programa:

-> Ciclo 1: 95°C, 7 minutos

-> Ciclo 2 (30x): 95°C, 135 segundos

50-55°C, 135 segundos

72°C, 135 segundos

-> Ciclo 3: 72°C, 10 minutos

-> Ciclo 4: 4°C

**Tabla 3.7 Mezcla de reacción estándar para la amplificación por PCR de genes de *T. thermophilus* HB27**

Componente	Concentración final
Tampón Tth 10X	10% (v/v)
Tth polimerasa	0,02 U. $\mu\text{L}^{-1}$
dNTPs	0,5 mM (cada uno)
Oligonucleótido 1	0,5 mM
Oligonucleótido 2	0,5 mM
ADN cromosómico	0,5-1 ng. $\mu\text{L}^{-1}$
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
DMSO	10% (v/v)
mqH <sub>2</sub> O	hasta 50 $\mu\text{L}$

En los casos requeridos, se utilizó una mezcla de polimerasas de *T. thermophilus* (Biotools B&M) y *Pyrococcus furiosus* (Biotools B&M) en relación 1:1 para aumentar la fidelidad de la PCR, ya que ésta última polimerasa, aunque menos procesiva que la Tth, produce menor tasa de error.

La subclonación en el vector pGEM-T se llevó a cabo mediante ligación de producto de PCR y vector en relación 3:1 empleando ligasa del fago T4 5 U. $\mu\text{L}^{-1}$  (New England Biolabs) según el método indicado por el fabricante. El producto de ligación se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se seleccionó en placas de agar LB<sub>A100</sub> suplementado con X-Gal 40  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .

La clonación en vectores de expresión se llevó a cabo por doble digestión de las construcciones de pGEM-T y del vector pET22b(+) mediante las restrictasas NdeI y EcoRI 1 U. $\mu$ L<sup>-1</sup> (New England Biolabs) empleando el tampón recomendado por el fabricante e incubando a 37°C durante toda la noche. Los productos de digestión se purificaron y se ligaron en proporción inserto-vector 3:1 utilizando la ligasa del fago T4 en las mismas condiciones. Los productos de ligación se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se seleccionaron en placas de agar LB<sub>A100</sub>. Los clones positivos se transformaron posteriormente en células competentes de *E. coli* BL21(DE3) para la expresión empleando el mismo método.

#### 3.4.3.2 Creación de librerías de mutantes por ISM

Las librerías de mutantes del gen *ttc1412* se generaron en las instalaciones del Prof. Reetz en el Max-Planck Institut für Köhlenforschung (Mülheim an der Ruhr, Alemania) siguiendo el método desarrollado por su grupo de trabajo (Reetz y Carballeira, 2007), a partir de la construcción pET22b-TTC1412 mediante PCR empleando oligonucleótidos con tripletes degenerados en las posiciones seleccionadas. Se empleó un termociclador Tgradient (Biometra) en las condiciones descritas en la tabla 3.8 con el siguiente programa:

-> Ciclo 1: 95°C, 3 minutos

-> Ciclo 2 (30x): 95°C, 1 minuto

53-57°C, 1 minuto

72°C, 8 minutos

-> Ciclo 3: 72°C, 10 minutos

-> Ciclo 4: 4°C

Tabla 3.8 Mezcla de reacción estándar para la generación de librerías de mutantes de *ttc1412*

Componente	Concentración final
Tampón KOD 10X	10% (v/v)
KOD polimerasa	0,02 U. $\mu\text{L}^{-1}$
dNTPs	0,2 mM (cada uno)
Oligonucleótido 1	0,25 $\mu\text{M}$
Oligonucleótido 2	0,25 $\mu\text{M}$
ADN molde	0,5-1 ng. $\mu\text{L}^{-1}$
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
mqH <sub>2</sub> O	hasta 50 $\mu\text{L}$

Los productos de PCR se incubaron directamente a 37°C con DpnI 0,5 U. $\mu\text{L}^{-1}$  durante toda la noche. Al día siguiente se añadió de nuevo DpnI hasta 1 U. $\mu\text{L}^{-1}$  y se incubó a 37°C durante 3 horas. La restrictasa DpnI corta selectivamente ADN metilado, asegurando que la mayoría del plásmido empleado como molde es destruido. Éste método permitió obtener un fondo de plásmido silvestre inferior al 25%.

Los productos de digestión se purificaron y transformaron por electroporación en células electrocompetentes de *E. coli* BL21(DE3), y seleccionados en placas de agar LB<sub>CB100</sub>.

### 3.4.4 Electroforesis y purificación de ADN

Todos los fragmentos de ADN se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 0,8-1,2% (p/v) preparado en TAE, añadiendo bromuro de etidio 1  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  para su posterior visualización bajo luz ultravioleta.

La purificación de fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante el kit PCR-Prep (Promega) o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 3.5 MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

### 3.5.1 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

La separación electroforética de proteínas se hizo en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las muestras se hirvieron durante 10 minutos en tampón de carga Laemmli 1x, y se centrifugaron durante 10 minutos a 14500 rpm en una centrífuga de mesa Minispin Plus (Eppendorf).

Los sobrenadantes se cargaron en minigeles SDS-PAGE discontinuos 10-12% (Laemmli y Favre, 1973). Tras la separación, los geles se lavaron tres veces en  $\text{mQH}_2\text{O}$  durante 10 minutos y se tiñeron con solución de tinción durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se descartó todo el líquido, se lavó en abundante  $\text{mQH}_2\text{O}$ , y se añadió solución de destinción hasta que las bandas de las proteínas se distinguieron claramente del fondo.

### 3.5.2 Expresión de proteínas de *T. thermophilus* HB27 en *E.coli* BL21(DE3)

Las células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el vector de expresión pET22b portando el gen de interés se cultivaron en medio líquido  $\text{LB}_{\text{A100}}$  o  $\text{M9}_{\text{A100}}$  a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial, estimada en una  $\text{DO}_{600} = 0,3-0,5$ . Alcanzado este punto, se añadió al cultivo IPTG 1 mM (concentración final) y se incubó hasta que alcanzó una  $\text{DO}_{600} = 1$ .

La expresión de las librerías de mutantes de *ttc1412* se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de 2,2 mL de capacidad conteniendo 800  $\mu\text{L}$  de medio líquido  $\text{LB}_{\text{CB100}}$  selladas con tapas permeables a gases. Las colonias obtenidas en el apartado 3.4.3.2 se inocularon en las placas multipocillo empleando un robot seleccionador de colonias QPIX (Genetix) y se incubaron en agitación a 37°C durante 16 horas, 800 rpm. Transcurrido éste tiempo, se inocularon 80  $\mu\text{L}$  del cultivo en placas multipocillo de 2,2 mL conteniendo 720  $\mu\text{L}$  de medio líquido  $\text{LB}_{\text{CB100}}$  con IPTG 0,1 mM usando un robot de pipeteo de 96 cabezales Genesis Workstation 150 (Tecan), y se permitió la expresión durante 16 horas. Finalizada la expresión, las células se lavaron dos veces en tampón fosfato sódico 50 mM pH= 7,0, se resuspendieron en 400  $\mu\text{L}$  del mismo tampón y se sellaron con tapas de aluminio.

### 3.5.3 Purificación por desnaturalización diferencial

Las proteínas de *T. thermophilus* HB27 expresadas en *E. coli* BL21(DE3) se purificaron empleando el método de desnaturalización diferencial, aprovechando la diferencia en la  $T_m$  entre las proteínas de origen termófilo y las del hospedador mesófilo.

Los cultivos inducidos se centrifugaron a  $6.000 \times g$  y 4°C durante 15 minutos en una centrífuga Avanti j-25 (Beckman-Coulter), y se resuspendieron en un volumen de tampón fosfato sódico 50 mM pH= 7,0, y se centrifugaron una vez más. Las células se resuspendieron en un volumen 1/100 de tampón fosfato sódico 50 mM pH= 7,0 y se sometieron a disrupción por ultrasonidos mediante tres pulsos continuos de 15 segundos al 100% de amplitud con descansos



de 1 minuto entre pulsos, siendo siempre mantenidas en hielo y usando un homogeneizador ultrasónico Labsonic M (Sartorius). Las muestras se centrifugaron para sedimentar células enteras y restos de paredes celulares, y los sobrenadantes se trasladaron a tubos de 1,5 mL.

Cuando la expresión se llevó a cabo en placas multipocillo, las células no se sonicaron, sino que se sometieron directamente al tratamiento térmico.

Los extractos celulares, o bien las placas multipocillo con las células resuspendidas, se incubaron a 80°C durante una hora, y finalmente se centrifugaron para sedimentar los agregados proteicos. La fracción soluble enriquecida en proteínas de *T. thermophilus* se transfirió a tubos de 1,5 mL y se midió su concentración usando el kit Protein assay (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **3.5.4 Purificación por cromatografía de intercambio iónico**

Las muestras destinadas a ultracentrifugación analítica y a análisis conformacionales se purificaron adicionalmente por cromatografía de intercambio iónico.

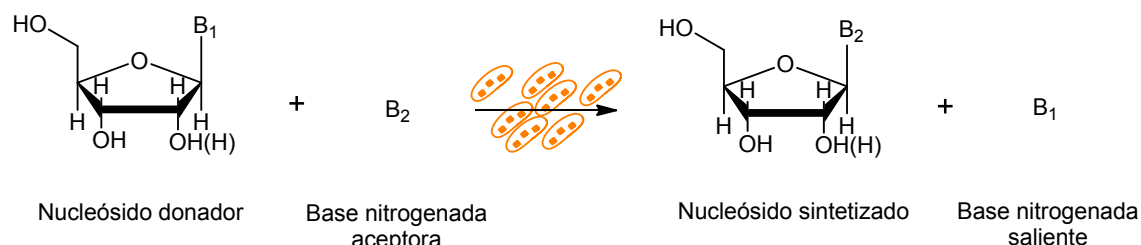
Los extractos purificados obtenidos en el apartado 3.5.3 se eluyeron mediante un gradiente de 0 a 0,5 M de NaCl a través de una columna Mini Macro-prep High Q montada sobre un sistema BioLogic LP (BioRad), previamente equilibrada en el mismo tampón que la muestra. Las fracciones recogidas se analizaron por SDS-PAGE, y aquellas que poseían la proteína de interés se unificaron, concentraron y desalaron empleando unidades de filtrado Amicon Ultra-15 (Millipore). El concentrado se eluyó una vez más en una columna Mini Macro-prep High S con un gradiente de NaCl de 0 a 0,5 M, y las fracciones conteniendo la proteína de interés se volvieron a desalar y concentrar. La concentración de proteínas se determinó mediante el kit Protein Assay (BioRad).

#### **3.5.5 Ensayos enzimáticos**

##### **3.5.5.1 Síntesis de nucleósidos empleando células enteras**

Las cepas de *T. thermophilus* se cultivaron en el medio y condiciones correspondientes hasta alcanzar la fase estacionaria, y posteriormente se centrifugaron a 6.000 x g durante 15 minutos. Las células se lavaron en tampón fosfato sódico 50 mM pH= 7,0 y se resuspendieron en una quinta parte del volumen del mismo tampón conteniendo los sustratos (nucleósido donador y

base nitrogenada aceptora) a una concentración final de 5 mM cada uno. La reacción de síntesis se resume en la figura 3.1. La reacción se mantuvo en agitación durante una hora a 65°C y 150 rpm, tras lo cual las muestras se filtraron mediante filtros de PTFE (politetrafluoroetileno) de 0,2 µm de diámetro de poro y se conservaron a 4°C hasta su análisis.



**Figura 3.1** Reacción de síntesis de nucleósidos por transglicosilación empleando células enteras de *T. thermophilus*. H: 2'-desoxirribosa; OH: ribosa.

La productividad de las reacciones se expresó en términos de mol de producto obtenido por millón de células, para lo cual se realizó una recta de calibrado con las diferentes cepas relacionando la  $DO_{660}$  de una suspensión con el número total de células por unidad de volumen de la misma, previamente determinado por conteo en cámara de Neubauer. El esquema de elaboración de dichas rectas de calibrado es el siguiente:

Se midió la  $DO_{660}$  de un cultivo líquido en fase estacionaria y se diluyó hasta un valor cercano a 1.

Se realizó una dilución 1:20 (v/v) en medio de cultivo y se contó el número de células mediante una cámara de Neubauer para obtener el valor  $N$ = millones de células por mL ( $Mc \cdot mL^{-1}$ )

Se añadieron 100 µL de la dilución anterior a una cubeta conteniendo 2 mL del mismo medio empleado y se anotó el valor obtenido,  $A_1$

Se repitió el paso anterior 9 veces hasta obtener el valor de  $A_{10}$  (SERIE1)

Se retiró 1 mL de la cubeta y se añadieron 100 µL de la dilución obtenida en el paso b, obteniendo el valor  $A_{11}$

Se repitió el paso anterior 9 veces hasta obtener el valor de  $A_{20}$  (SERIE2)

Se calcularon los valores  $N_n$  que se correspondían con  $A_n$  en base a la siguiente fórmula:

SERIE1:

SERIE2:

$$N_1 = N^*(0,1/2,1)$$

$$N_{11} = N^*(2,1/2)$$

$$N_2 = N^*(0.2/2.2)$$

$$N_{12} = N^*(2.2/2)$$

...

...

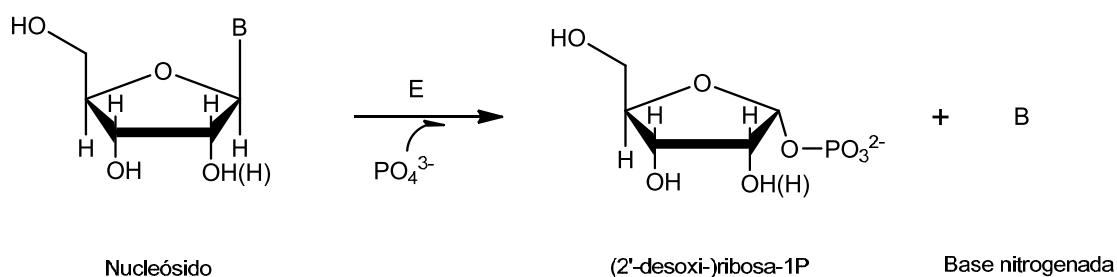
$$N_{10} = N^*(1/3)$$

$$N_{20} = N^*(3/2)$$

Se representó  $A_n$  frente a  $N_n$  y se obtuvo la ecuación de la recta ajustada

### 3.5.5.2 Fosforólisis de nucleósidos empleando enzimas

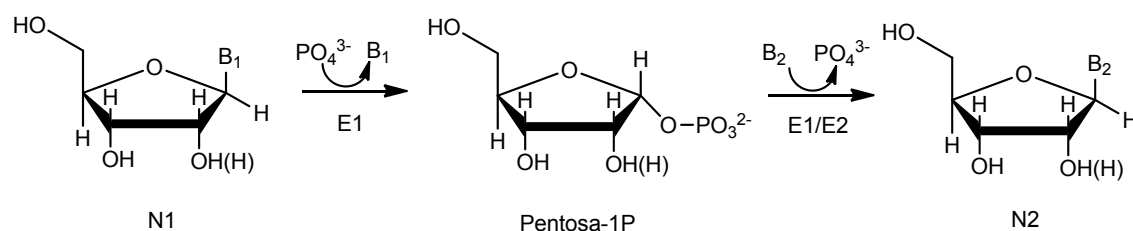
La mezcla de reacción estándar para la fosforólisis de nucleósidos se constituyó por tampón fosfato sódico 50 mM pH= 7,0 conteniendo sustrato 5 mM. La reacción se llevó a cabo en tubos de 1,5 mL conteniendo la mezcla de reacción y se inició al añadir el extracto enzimático obtenido en el apartado 3.5.3 o el derivado inmovilizado obtenido en el apartado 3.8. La reacción se dejó progresar en un baño con agua a la temperatura adecuada durante el tiempo necesario y se detuvo añadiendo un volumen de metanol frío. La reacción de fosforólisis se resume en la figura 3.2. La mezcla se agitó vigorosamente 2-3 veces y se introdujo inmediatamente en hielo hasta su análisis.



**Figura 3.2** Reacción de fosforólisis de nucleósidos empleando enzimas (E) de *T. thermophilus* HB27. H: 2'-desoxirribosa; OH: ribosa.

### 3.5.5.3 Síntesis de nucleósidos empleando enzimas

La reacción de síntesis se realizó en un mismo tubo mediante el mecanismo en dos pasos resumido en la figura 3.3.



**Figura 3.3** Reacción de síntesis de nucleósidos empleando enzimas de *T. thermophilus* HB27. En un primer paso, una enzima (E1) fosforila un nucleósido (N1) liberando la base nitrogenada (B<sub>1</sub>) y una pentosa-1P. En un segundo paso la misma enzima (E1) o una segunda (E2) emplea la pentosa-1P y una base nitrogenada aceptora (B<sub>2</sub>) para llevar a cabo la reacción inversa, sintetizando un nuevo nucleósido (N2). H: 2'-desoxirribosa; OH: ribosa.

La mezcla de reacción estándar para la síntesis de nucleósidos estaba compuesta de tampón fosfato sódico 50 mM pH= 7,0, nucleósido donador (N1) 5 mM, base aceptora (B<sub>2</sub>) 5 mM. La reacción se llevó a cabo en tubos de 1,5 mL conteniendo la mezcla de reacción y se inició al añadir el extracto enzimático obtenido en el apartado 3.5.3. La reacción se dejó progresar en un baño con agua a la temperatura adecuada y se detuvo añadiendo un volumen de metanol frío. La mezcla se agitó vigorosamente 2-3 veces y se introdujo inmediatamente en hielo hasta su análisis.

#### 3.5.5.4 Cribado en placas multipocillo

Los extractos purificados conteniendo las variantes de la proteína TTC1412 obtenidos en el apartado 3.5.3 se emplearon en reacciones test a fin de evaluar su capacidad para fosforilizar arabinósidos. Para ello se dispensaron en placas multipocillo de 2,2 mL 100 µL de extracto enzimático y 100 µL de tampón fosfato sódico 50 mM pH= 7,0 conteniendo uracilo-1-β-D-arabinofuranósido 4 mM, usando un robot de pipeteo de 96 cabezales Genesis Workstation 150 (Tecan). Las placas se sellaron con tapas de aluminio y se incubaron a 70°C durante 2 horas. Finalizado el tiempo, se detuvo la reacción por adición de un volumen de metanol frío, y se transfirieron 200 µL de la muestra a placas multipocillo, que se sellaron con una tapa de aluminio y se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

### 3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

El análisis de todas las reacciones se siguió por HPLC en condiciones de fase reversa en un equipo Agilent Serie 1100 equipado una columna C18 Mediterranea Sea (15 cm x 0.46 cm,

tamaño de partícula de 5µm, Teknokroma) termostatzada a 37°C, un detector ultravioleta ( $\lambda$ = 254 nm). La fase móvil empleada fue en todos los casos H<sub>2</sub>O/metanol en diferentes proporciones, atendiendo a la naturaleza química del analito.

El análisis de los resultados de la reacción de fosforólisis del uracilo-1-β-D-arabinofuranósido para las distintas librerías de mutantes de TTC1412 se llevó a cabo por HPLC en fase reversa en un LC-20AD (Shimadzu) equipado con inyector automático adaptado para el análisis en placas multipocillo, empleando una columna Eclipse PlusC18 (15 cm x 0.46 cm, tamaño de partícula de 5µm, Zorbax) y un detector ultravioleta a 254 nm.

Estas condiciones de análisis permiten detectar los anillos aromáticos de las bases nitrogenadas, sea en su forma libre o conjugada. Los ensayos de actividad fosforilasa fueron evaluados en función de la proporción entre la base nitrogenada liberada y el nucleósido remanente. Los ensayos de síntesis de nucleósidos se evaluaron en función de la proporción entre el nucleósido sintetizado y la base nitrogenada aceptora remanente.

### **3.7 ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA**

Los experimentos de ultracentrifugación analítica se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, España) en una ultracentrífuga Optima XL-I (Beckman-Coulter) equipada con detector ultravioleta y un rotor An-50Ti con piezas centrales de doble sector de 1,2 cm de Epon-charcoal. Las muestras de proteína se analizaron a 20°C en tampón fosfato sódico 50 mM pH= 7,0. En todos los casos la pureza de las proteínas fue mayor del 90%, y su concentración no superior a 1,1 mg.mL<sup>-1</sup>. Por cada proteína se analizaron dos concentraciones diferentes, 1x y 2x. Se llevaron a cabo experimentos de velocidad de sedimentación y equilibrio de sedimentación con el objeto de determinar la masa molar de las proteínas purificadas en el apartado 3.5.4.

#### **3.7.1 Velocidad de sedimentación**

Las muestras se centrifugaron a 120.000 x g. Los datos experimentales de concentración frente al radio obtenidos a lo largo del tiempo fueron analizados mediante el programa SEDFIT para obtener los valores de coeficiente de sedimentación (S) frente a la distribución aparente del coeficiente de sedimentación c(s). Esta representación permitió obtener información acerca de la cantidad de especies presentes en una muestra, así como una aproximación a la masa molecular.

### 3.7.2 Equilibrio de sedimentación

Para la obtención de valores precisos de masa molar se llevaron a cabo estudios de equilibrio de sedimentación. Las muestras se sometieron a campos de fuerza crecientes desde 3.000 a 14.000 x g. En estas condiciones el desplazamiento de las proteínas a lo largo del eje de rotación y la difusión quedan compensados, llegando a un punto de equilibrio. Alcanzado este estado, los datos experimentales se analizaron y se convirtieron a valores de masa molecular boyante ( $M_b$ ), y se corrigieron posteriormente a masa molecular ( $M$ ) a través de la fórmula  $M_b = M(1 - v_r)$ , donde  $v$  es el volumen específico parcial de la proteína, calculado teóricamente a partir de su composición en aminoácidos, y  $r$  es la densidad del tampón. Para todos los cálculos se utilizó la herramienta HETEROANALYSIS.

## 3.8 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS EN SOPORTE SÓLIDO

### 3.8.1 Soportes empleados

Los soportes EC-EP (epóxido) y EC-HFA (aminoepóxido) se compraron a Resindion S.L.R. (Mitsubishi Chemical Corporation). Los soportes DEAE- y Q-agarosa se compraron a Biorad. La PEI se compró a Aldrich y se preparó siguiendo el protocolo descrito por Mateo (Mateo y cols., 2000). El soporte MANAE-agarosa se sintetizó siguiendo el método descrito por Fernández-Lafuente (Fernandez-Lafuente y cols., 1993). Todos los soportes fueron cedidos amablemente por el grupo del Dr. Guisán (Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, España).

### 3.8.2 Inmovilización de enzimas sobre soportes covalentes

#### 3.8.2.1 Inmovilización de enzimas sobre soportes funcionalizados con grupos epóxido

Los soportes se prelavaron con  $mqH_2O$  y se secaron por filtración en un matraz kitazato con filtro acoplado a una bomba de vacío, tras lo cual se preparó la muestra de proteína a  $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$  en tampón fosfato sódico 1 M, pH= 7,0. La alta fuerza iónica del tampón favorece la unión al soporte ya que ésta se produce en dos pasos: i) una interacción hidrofóbica, rápida y reversible, que está favorecida en condiciones de alta fuerza iónica, y ii) una unión covalente más lenta entre los grupos epóxido del soporte y los grupos  $\epsilon$ -amino de las lisinas de la superficie de la proteína próximos en el espacio.

Se puso en contacto 1 g de soporte y 10 mL de proteína a  $4^\circ\text{C}$  en agitación durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se tomó una muestra del sobrenadante (SB1), se filtró y lavó el

soporte en 10 mM de agua pura, calidad mili-Q ( $\text{mqH}_2\text{O}$ ) durante 15 minutos para eliminar la proteína no unida covalentemente, se tomó al final una muestra del sobrenadante (SB2) y, finalmente, se volvió a filtrar. Se realizaron dos lavados más en  $\text{mqH}_2\text{O}$ , se añadieron 10 mL de glicina 3 M,  $\text{pH}=8,5$  para bloquear los grupos epóxido libres (Mateo y cols., 2003) y se mantuvo 24 horas a  $4^\circ\text{C}$  en agitación. El derivado inmovilizado se lavó en tampón fosfato sódico 50 mM  $\text{pH}=7,0$ , se secó por filtración y se almacenó a  $4^\circ\text{C}$  hasta su empleo en ensayos de actividad.

Para evaluar la unión de la proteína al soporte, se utilizó el kit Protein Assay (BioRad) para medir la concentración de proteína de las muestras SB1 y SB2. Teniendo en cuenta los volúmenes empleados en unión y lavado, y las concentraciones de proteína obtenidas, se calculó el porcentaje de proteína no unida covalentemente, teniendo en cuenta que la proteína presente en SB1 no interaccionó con el soporte, y la presente en SB2 se adsorbió por interacción hidrofóbica pero se desorbió durante el lavado a baja fuerza iónica.

#### 3.8.2.2 Inmovilización de enzimas sobre soportes funcionalizados con grupos aminoepóxido

Los soportes se acondicionaron como se indicó en el apartado 3.8.1.1, y la muestra de proteína se preparó a  $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$  en tampón fosfato sódico 10 mM,  $\text{pH}=7,0$ . En los soportes funcionalizados con grupos aminoepóxido, al contrario que en el caso de la unión a grupos epóxido, la primera interacción se produce por atracción de cargas entre los grupos amino del soporte y los carboxilos de la superficie de la proteína, por lo que se tuvo que mantener la fuerza iónica lo más baja posible para permitir el establecimiento de estos enlaces iónicos.

Se puso en contacto 1 g de soporte y 10 mL de proteína a  $4^\circ\text{C}$  en agitación durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se tomó una muestra del sobrenadante (SB1), se filtró y lavó el soporte en 10 mL de NaCl 1 M durante 15 minutos para eliminar la proteína no unida covalentemente, se tomó al final una muestra del sobrenadante (SB2) y se volvió a filtrar. Se realizaron dos lavados más en NaCl 1 M, se añadieron 10 mL de glicina 3 M,  $\text{pH}=8,5$  para bloquear los grupos epóxido libres (Mateo y cols., 2003) y se dejó 24 horas a  $4^\circ\text{C}$  en agitación. El derivado inmovilizado se lavó en tampón fosfato sódico 50 mM  $\text{pH}=7,0$ , se secó por filtración y se almacenó a  $4^\circ\text{C}$  hasta su empleo en ensayos de actividad.

La unión de la proteína al soporte se evaluó de la misma manera que en el apartado 3.8.1.1.

### 3.8.3 Inmovilización de enzimas sobre soportes iónicos

Las muestras de proteínas se prepararon a  $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$  en tampón fosfato sódico 50 mM, pH= 7,0 y se pusieron en contacto con 1 g de soporte iónico (DEAE-, Q-, PEI- o MANAE-agarosa), previamente lavado en  $\text{mqH}_2\text{O}$  y filtrado, a  $4^\circ\text{C}$  con agitación. De forma periódica se tomaron muestras del sobrenadante y se midió su concentración de proteínas para determinar el porcentaje de proteína unida. Cuando el porcentaje se mantuvo constante, los soportes se filtraron y resuspendieron en 10 mL de glutaraldehído 0,5 % (v/v) y se mantuvieron durante una hora a  $4^\circ\text{C}$  en agitación. El glutaraldehído es un agente entrecruzante que crea uniones covalentes entre las aminos del soporte y las  $\epsilon$ -aminas de las lisinas de superficie en la proteína, evitando la posterior desorción de ésta durante los ensayos de actividad.

## 3.9 ANÁLISIS CONFORMACIONAL MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA

Se empleó un espectrofluorímetro AMINCO-Bowman Series 2 (Thermo) acoplado a un baño de agua con circulación continua y agitación magnética. Se estableció la longitud de onda del monocromador de excitación en 280 nm y se registró el espectro de emisión entre 300 y 400 nm como la media de tres medidas consecutivas. Antes de la medición, las muestras se mantuvieron en la cámara durante 15 minutos para su acondicionamiento a las condiciones experimentales. Cuando fue necesario, los espectros obtenidos se deconvolucionaron empleando la utilidad SOLVER, incluida en el programa Microsoft Excel. Todas las muestras de proteína analizadas provinieron de la purificación detallada en el apartado 3.5.4

## 3.10 HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS

### 3.10.1 Análisis de secuencias

Para el ensamblado, comparación y traducción de secuencias se empleó el programa Gene Jockey II para Macintosh y para el diseño de oligonucleótidos se utilizó el programa VectorNTI para PC. Las búsquedas de homología se hicieron a través mediante el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, (Altschul y cols., 1997) y los alineamientos de secuencia a través de CLUSTALW (Larkin y cols., 2007), ambos alojados en el servidor NCBI. Para la predicción de dominios se empleó el servidor Pfam (Finn y cols., 2008).

La base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, (Kanehisa y Goto, 2000; Kanehisa y cols., 2010)) se utilizó para obtener la información acerca de vías metabólicas,



reacciones enzimáticas y bases de datos de ligandos. La búsqueda de secuencias de *T. thermophilus* se realizó mediante el del servidor BacMap que dispone de una amplia base de datos de genomas secuenciados, así como otras herramientas integradas para la búsqueda de secuencias por homología. Las estructuras tridimensionales se consultaron en el servidor PDB (Protein Data Bank, (Bernstein y cols., 1978)).

### 3.10.2 Modelado por homología y *docking* molecular

Para realizar el modelado por homología de la proteína TTC1412 se empleó la macro *hm\_build* del paquete informático YASARA. El *docking* molecular de diferentes ligandos sobre el mejor modelo de homología obtenido se llevó a cabo mediante una macro personalizada de 3 Å de RSMD mínimo para el ligando y 25 iteraciones, utilizando el campo de fuerza YASARA2. Finalmente, se minimizó la energía del complejo tanto *in vacuo* como en presencia de H<sub>2</sub>O mediante la macro *em\_run* utilizando el campo de fuerza YASARA2.

### 3.10.3 CASTing

La selección de los residuos susceptibles de ser modificados por ISM (apartado 3.4.3.2) se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por el grupo del Dr. Reetz (Reetz y Carballeira, 2007) sobre el modelo obtenido en el apartado 3.10.2 empleando la aplicación DS Visualizer incluido en el paquete Discovery Studio (Accelrys).







## 4 RESULTADOS

### CAPÍTULO 1. SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS EMPLEANDO CÉLULAS DE *T. thermophilus*

El primer bloque de trabajo se centró en la búsqueda de actividades de interés mediante ensayos test empleando células enteras de diferentes cepas de *T. thermophilus*. La síntesis de nucleósidos por transglicosilación (es decir, transferencia de un residuo de pentosa desde un nucleósido hasta una base nitrogenada aceptora) observada en estos microorganismos se consideró la más relevante a este respecto.

#### 4.1.1 Reacciones de síntesis de nucleósidos catalizadas por células enteras de *T. thermophilus*

##### 4.1.1.1 Selectividad frente a la base purínica y estructura del anillo de pentosa

Como primera aproximación, se estudió la capacidad de las cepas de *T. thermophilus* para sintetizar nucleósidos de purina a partir de un nucleósido de pirimidina y una purina libre. La reacción de síntesis se llevó a cabo empleando células en condiciones de *no crecimiento*, es decir, cultivadas en medio líquido hasta alcanzar la fase estacionaria y posteriormente centrifugadas y resuspendidas en un tampón (ver apartado 3.5.5.1 para los detalles experimentales). Se llevaron a cabo cuatro tipos de reacción a fin de evaluar la selectividad de las cepas frente a 6-oxopurinas (hipoxantina) y 6-aminopurinas (adenina), así como su capacidad para distinguir entre ribósidos y 2'-desoxirribósidos (Figura 4.1).

Todas las cepas estudiadas catalizaron la síntesis de nucleósidos de purina, y el perfil observado de selectividad hacia la base aceptora fue uniforme entre las once cepas; los valores de productividad de síntesis de nucleósidos 6-oxopurínicos y 6-aminopurínicos fueron similares, excepto en el caso de las cepas FIJ13A1 y VG7, que presentaron un 50% más de actividad frente a 6-oxopurinas que frente a 6-aminopurinas (Figura 4.2). La reacción tuvo lugar cuando el nucleósido donador contenía tanto ribosa como 2'-desoxirribosa, si bien las conversiones obtenidas con 2'-desoxirribosa fueron casi el doble para todas las cepas, lo que pone de relieve una selectividad generalizada hacia 2'-desoxinucleósidos. Las cepas VG7 y FIJ13A1 fueron las más productivas en la síntesis de purinas, mientras que NAR1 y RQ1 fueron las que dieron menor rendimiento.

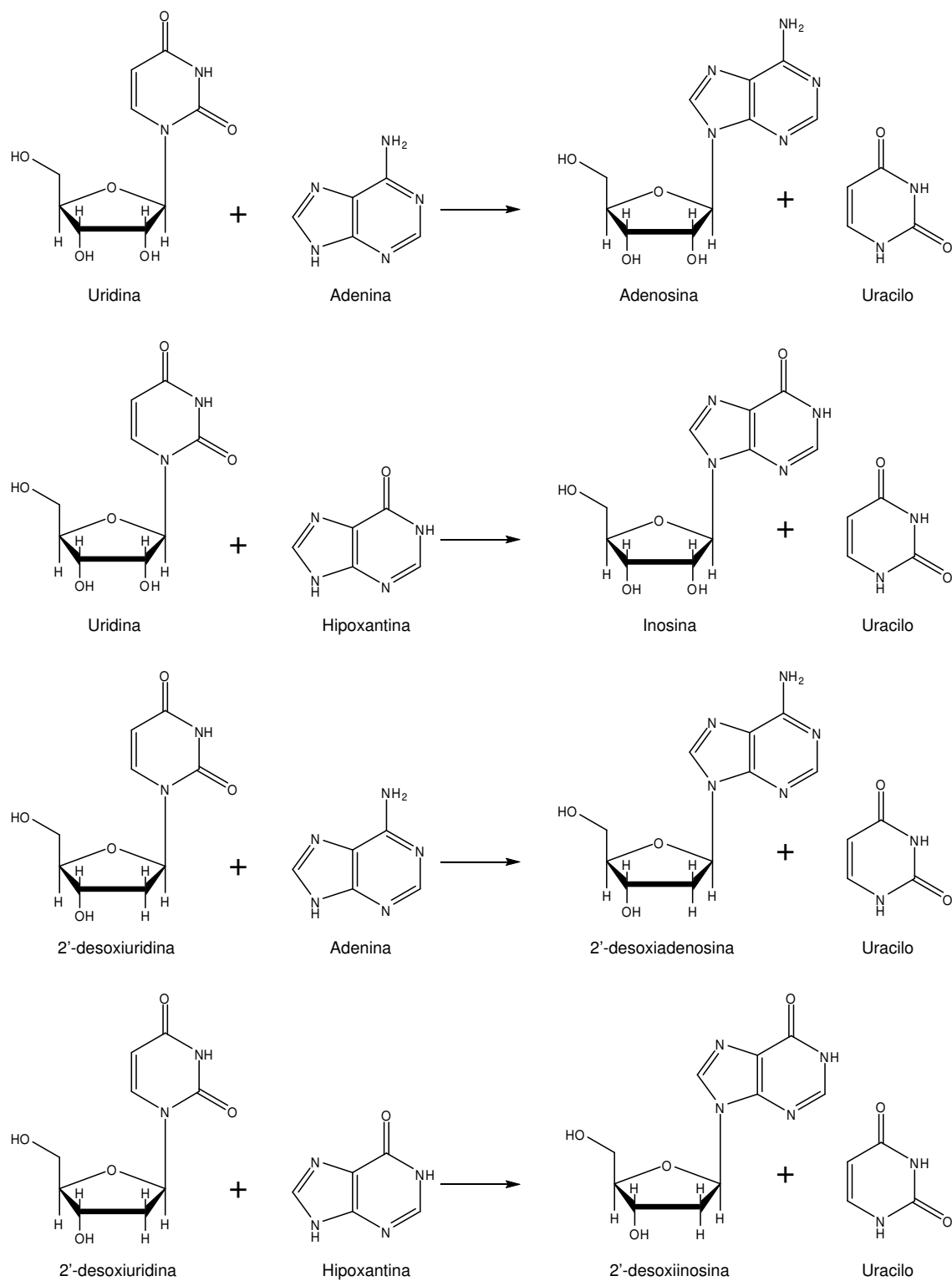


Figura 4.1 Esquema de las reacciones de evaluación de síntesis de nucleósidos de purina por transglucosilación empleando células de *T. thermophilus*.

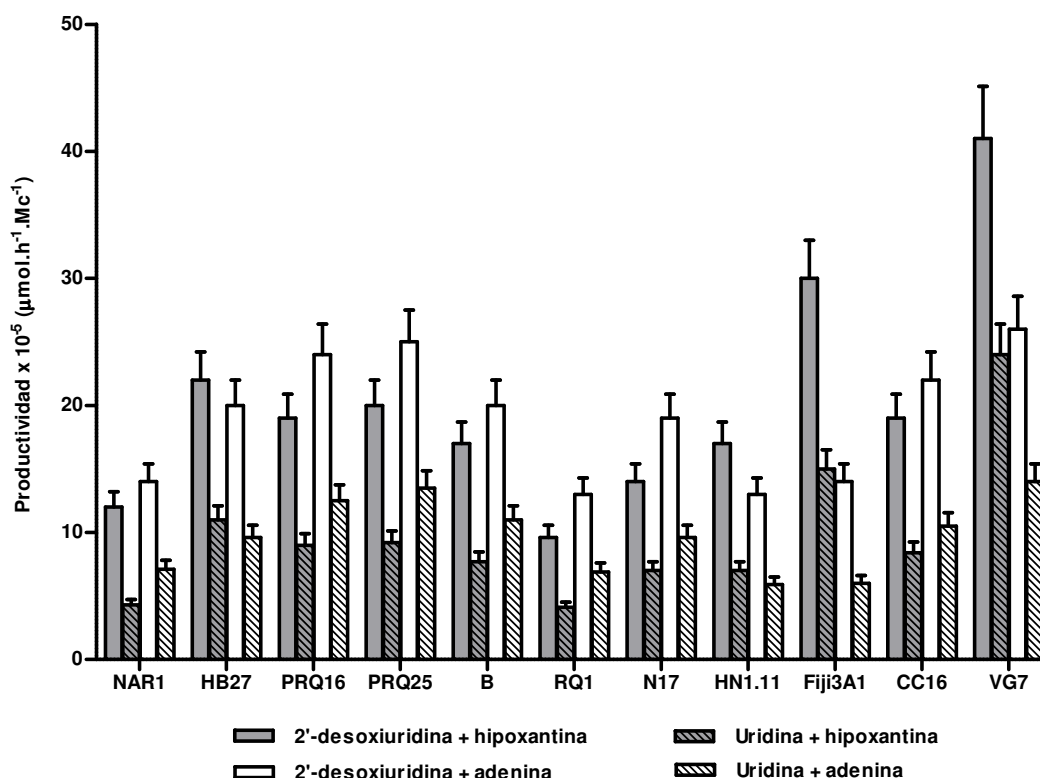


Figura 4.2 Productividad de la síntesis de nucleósidos de purina empleando células enteras de *T. thermophilus* en condiciones de no crecimiento.

En microorganismos mesófilos es frecuente encontrar subproductos de desaminación cuando se trabaja con 6-aminopurinas (Trelles y cols., 2004; Santaniello y cols., 2005; Trelles y cols., 2005). Estas desaminaciones se atribuyen a las actividades adenosín-deaminasa (ADA, EC 3.5.4.4) y adenasa (EC 3.5.4.2), que desaminan nucleósidos de adenina o adeninas libres y generan como subproductos inosina, hipoxantina y sus nucleósidos, lo que reduce ostensiblemente la productividad del proceso (Figura 4.3). En estos casos el problema se ha solventado elevando la temperatura de la reacción hasta los 60°C, donde la ADA se desactiva mientras que se preserva la actividad sintetasa, si bien estas condiciones de reacción tienen un impacto negativo sobre la viabilidad celular (Condezo y cols., 2006). En el caso de las cepas de *T. thermophilus*, las reacciones de síntesis empleando aminopurinas transcurrieron de manera limpia sin que se observara la aparición de picos secundarios atribuibles a la aparición de 6-oxonucleósidos o 6-oxopurinas como producto de la desaminación degradativa catalizada por una adenasa o una ADA en los perfiles de HPLC (datos no mostrados).

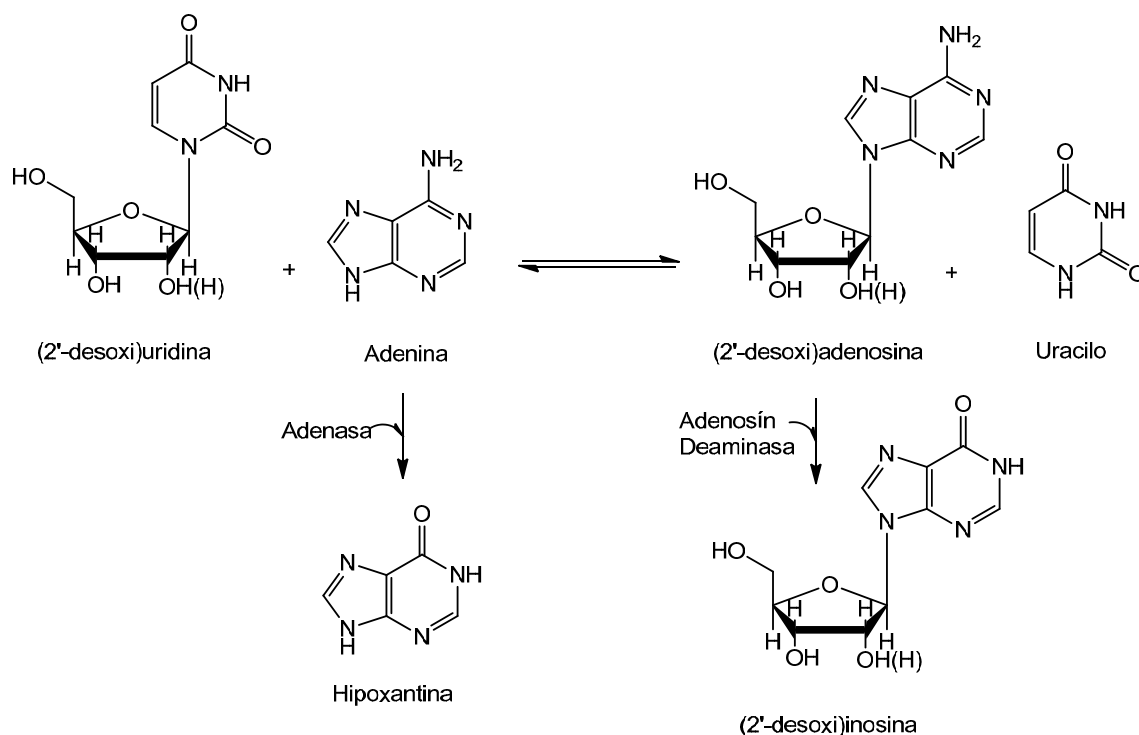


Figura 4.3 Efecto de las actividades adenosín-deaminasa y adenasa en la síntesis de nucleósidos de 6-aminopurina.

#### 4.1.1.2 Selectividad frente a la pirimidina del nucleósido donador

Una vez establecidas las selectividades aparentes hacia la purina aceptora y la pentosa transferida a ésta, se llevaron a cabo dos nuevas series de reacciones con el objeto de determinar la especificidad hacia la pirimidina del donador. Para ello se utilizaron nucleósidos de timina o de uracilo como donadores de la reacción (Figura 4.4). Estas reacciones se realizaron con aquellas cepas que mostraron mejor productividad en el apartado anterior.

Los resultados de esta nueva serie de reacciones se resumen en la figura 4.5, donde se incluyen las productividades obtenidas anteriormente con 2'-desoxiuridina (ver Figura 4.2) para facilitar su comparación. Todas las cepas empleadas fueron capaces de sintetizar nucleósidos de purina empleando timidina como donador de nucleósidos, y los valores observados de productividad en la síntesis de 2'-desoxiadenosina fueron muy similares tanto cuando se empleó timidina como 2'-desoxiuridina como nucleósido donador, si bien las cepas PRQ16 y PRQ25 fueron más productivas con éste último. En contraposición, la productividad en la síntesis de 2'-desoxiinosina de todas las cepas se redujo entre un 30 y un 50% cuando se utilizó timidina. VG7 fue la cepa que mostró mayor productividad para la síntesis de nucleósidos de purina empleando timidina como donador, mientras que FIJ13A1 fue la menos productiva, en contraste con lo observado en el apartado anterior.



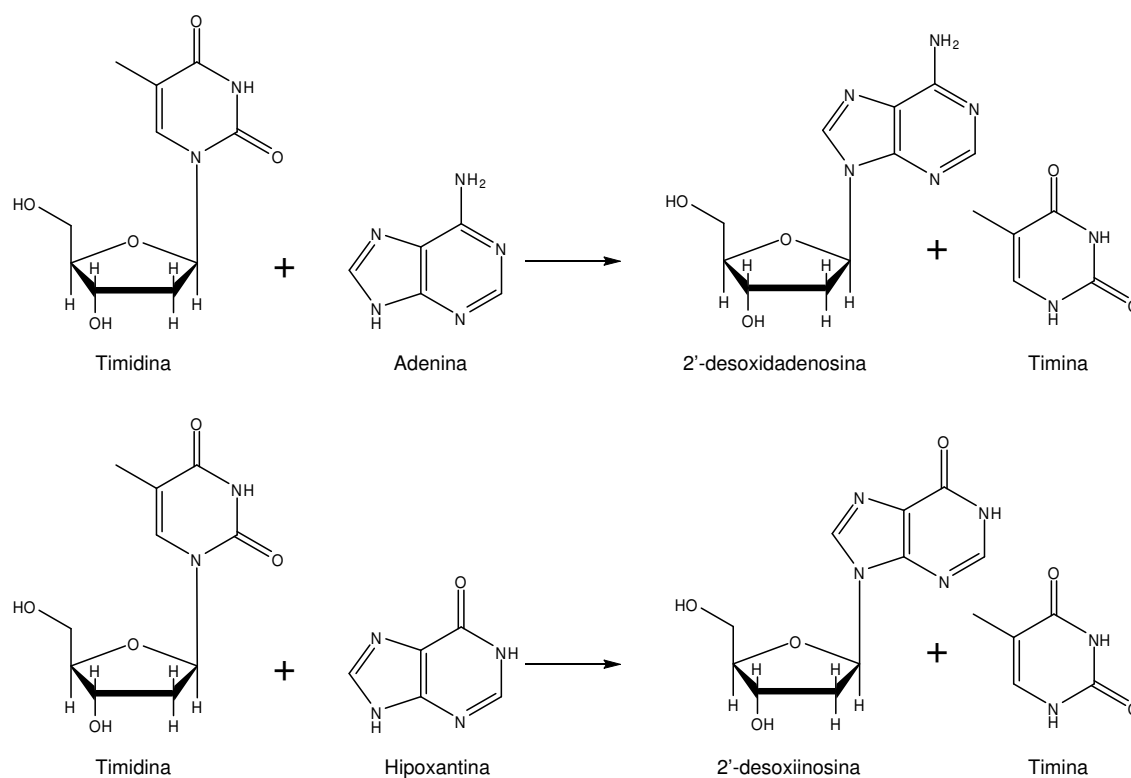


Figura 4.4 Reacciones para la evaluación de la especificidad de pirimidinas en la síntesis de nucleósidos de *T. thermophilus*.

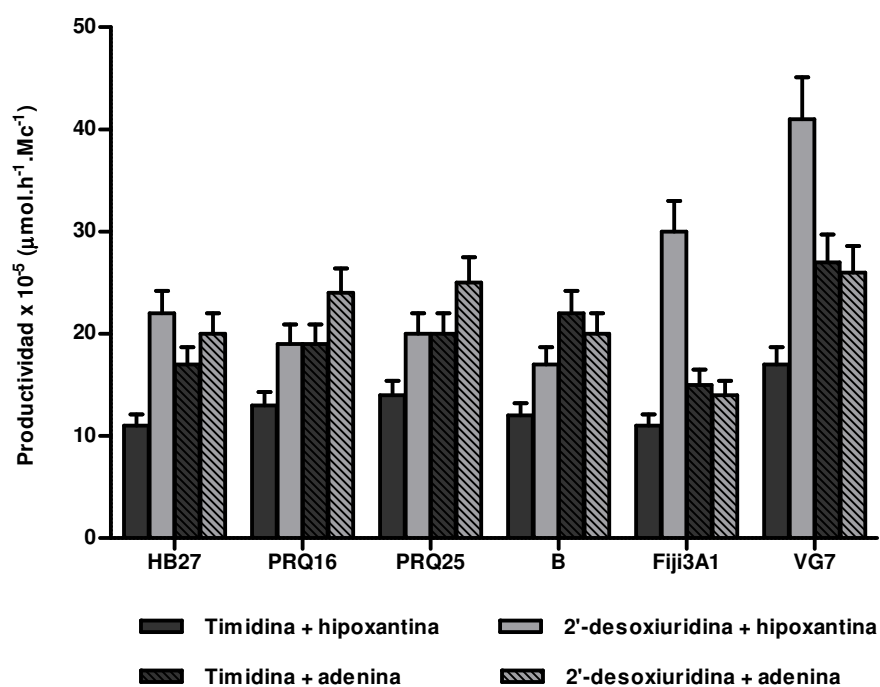


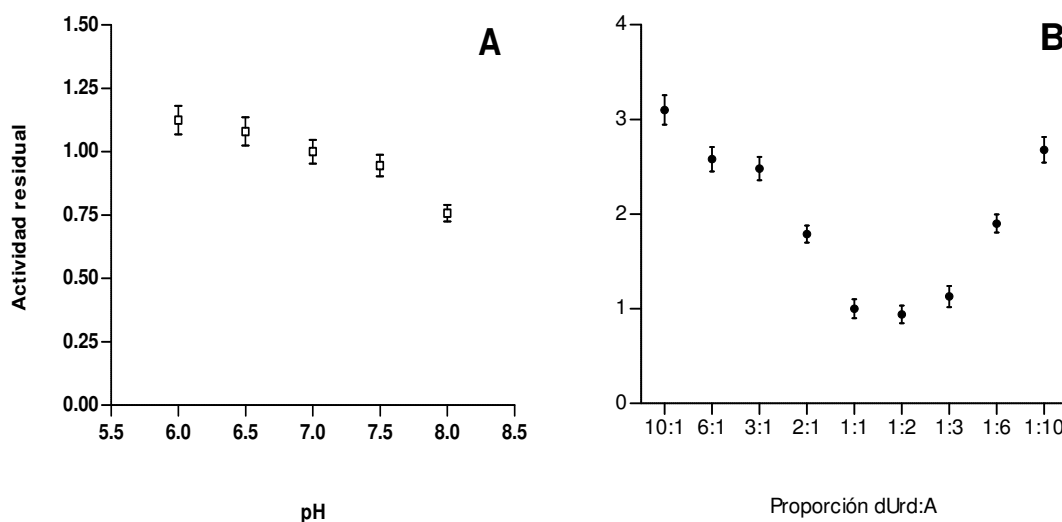
Figura 4.5 Productividad de diferentes cepas de *T. thermophilus* en la síntesis de nucleósidos de purina empleando diferentes nucleósidos de pirimidina como donador de pentosa.

#### 4.1.2 Influencia del pH y la relación molar de sustratos en la productividad de la síntesis

Se estudió la influencia de dos parámetros sobre la productividad de *T. thermophilus* HB27 en la síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxiuridina: el valor de pH del tampón de reacción y la relación molar nucleósido donador/base aceptora. Se eligió la cepa HB27 al ofrecer sobre el resto la ventaja de poseer el genoma secuenciado, lo que permitiría un posterior cribado virtual del mismo para la clonación de enzimas. Partiendo de las condiciones estándar de síntesis (ver apartado 3.5.5.1), se hicieron sucesivos ensayos variando el parámetro a estudiar.

La reacción transcurrió mejor a valores de pH ácidos, si bien la diferencia en la actividad entre 6,0 y 8,0 fue inferior al 25% (Figura 4.6A). A valores de pH inferiores a pH 6,0 no se pudo determinar la actividad debido a problemas de viabilidad celular. Esta tolerancia a amplios rangos de pH se correlaciona con lo expuesto durante el capítulo de introducción, según lo cual los microorganismos termófilos, a diferencia de los mesófilos, poseen una resistencia adaptativa a condiciones de mayor acidez, exhibiendo por ello rangos en lugar de valores puntuales óptimos de pH. A la hora de emplear un biocatalizador en una biotransformación, esta tolerancia permite una mayor flexibilidad en las condiciones de reacción empleadas, así como en su control.

En cuanto a la influencia de la relación molar de sustratos sobre la actividad sintética de las células, ésta aumentó cuando se emplearon los sustratos en una relación molar diferente a la estequiométrica, 1:1 (Figura 4.6B). A éste respecto, la adición de un exceso de nucleósido donador operó con un mayor aumento de la actividad que cuando se añadió un exceso de base aceptora, observándose la mayor actividad cuando se utilizó una relación molar de 10:1. Aunque este hecho pondría de manifiesto que la síntesis está limitada por la disponibilidad del nucleósido donador de pentosa, el efecto observado por la adición de un exceso de éste frente al de un exceso de base nitrogenada aceptora supone una mejora de la productividad moderada. Por lo tanto, y debido al elevado precio de algunos de reactivos, su consumo en exceso deberá ser evaluado.



**Figura 4.6 Efecto de A) pH del tampón de reacción y B) proporción nucleósido donador/base aceptora en la síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxiuridina empleando células enteras de *T. thermophilus* HB27.** Condiciones del valor central: [dUrd]= 5 mM; [A]= 5 mM en tampón fosfato sódico 50 mM, pH= 7,0. Actividad expresada en términos relativos con respecto al valor central. dUrd= 2'-desoxiuridina; A= adenina.

## CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN, EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUCLEÓSIDO FOSFORILASAS DE *T. thermophilus* HB27

En las células enteras empleadas como biocatalizadores, la maquinaria celular se mantiene en estado latente, aún cuando se emplean células en condiciones de *no crecimiento*. Ello conlleva la aparición en ciertos casos de reacciones no esperadas con formación de productos secundarios. Además, el empleo de células enteras a escala industrial lleva asociados otros problemas, como el mantenimiento de la viabilidad celular y la necesidad de regular la vía metabólica de interés. Debido a esto, se decidió indagar en el mecanismo responsable de la actividad observada con el fin de identificar y aislar las enzimas implicadas para su posterior aplicación en procesos de síntesis más fácilmente controlables. El presente capítulo aborda el estudio del genoma de la cepa HB27 y la identificación, clonación y purificación de proteínas candidatas, así como su posterior caracterización bioquímica, estudio de sus parámetros cinéticos y determinación de su estructura oligomérica.

### 4.2.1 Búsqueda de genes homólogos

A lo largo del Capítulo 1 se estudió la síntesis de nucleósidos por transferencia de una pentosa desde un nucleósido que actuaba de donador hasta una base nitrogenada que actuaba de aceptora. Tal como se discutió previamente en la introducción, hay dos enzimas

capaces de llevar a cabo la transglicosilación de nucleósidos, las nucleósido fosforilasas (NPs, EC 2.4.2.1 y 2.4.2.2) y las nucleósido-desoxirribosiltransferasas (NdRTs, EC 2.4.2.6), de modo que se llevó a cabo la búsqueda de genes cuyos productos estuvieran anotados como tales en el genoma de *T. thermophilus* HB27. La cepa seleccionada para el cribado virtual fue HB27, ya que junto a HB8 es la única cepa cuyo genoma está secuenciado (Henne y cols., 2004; Takayama y cols., 2004).

El genoma de HB27 contenía dos genes cuyos productos estaban anotados como putativas purín nucleósido fosforilasas (PNPs): *TTC0194* (275 aminoácidos, 30 KDa) y *TTC1070* (235 aminoácidos, 25 KDa), y uno cuyo producto estaba anotado como una putativa timidín fosforilasa, *TTC1412* (423 aminoácidos, 45 KDa), todos ellos codificados en el cromosoma.

La identificación de motivos en los productos de expresión teóricos puso de manifiesto la existencia de un dominio PNP\_UDP\_1 (superfamilia de las fosforilasas) en *TTC0194* y *TTC1070*, y un dominio PYNP\_C (pirimidín nucleósido fosforilasa) así como un dominio parcial glicosiltransferasa en *TTC1412*.

Empleando las secuencias de *TTC0194*, *TTC1070* y *TTC1412*, se hizo una nueva búsqueda por homología en el genoma de HB27. Se seleccionaron once genes que se sometieron a una nueva identificación de dominios a fin de determinar su pertenencia a la superfamilia de las fosforilasas o glicosiltransferasa. De los once genes, se seleccionaron tres para su clonación: *TTC1185* (220 aminoácidos, 23 KDa), producto anotado como una putativa nucleosidasa, con un dominio parcial PNP\_UDP\_1; *TTC1491* (329 aminoácidos, 34 KDa), producto anotado como antranilato fosforribosiltransferasa, con un dominio glicosiltransferasa; *TTC0188* (225 aminoácidos, 24 KDa), producto anotado como proteína hipotética y con un dominio PNP\_UDP\_1. Estos tres genes también se encontraban codificados en el cromosoma.

En total fueron seis secuencias las seleccionadas para su clonación, cuyo contexto genético se detalla en figura 4.7. Debido a la ausencia de información acerca de la posible función del producto de *TTC0188*, se llevó a cabo una búsqueda por homología en la base de datos de secuencias no redundantes de proteínas del NCBI. Los mejores valores E se obtuvieron con la enzima futasina sintasa de microorganismos pertenecientes al género *Thermus* y *Meiothermus*. La actividad futasina sintasa se engloba en una ruta alternativa recientemente descrita para la síntesis de menaquinona (Hiratsuka y cols., 2008) y su sustrato, la futasina, consta una inosina conjugada con una molécula de corismato. Su contexto genético no se asoció con ninguna proteína de esta ruta alternativa, y se situó junto a

proteínas del ribosoma y un factor de iniciación de la transcripción tipo IF-3, además de dos genes de función desconocida similares a una glicerol-3-fosfato aciltransferasa (biosíntesis de lípidos) y un homólogo de proteínas de exportación de drogas.

El gen *TTC0194* se situó junto al gen *YlmE*, cuya función es desconocida, y al de otro codificante de una proteína, de función también desconocida, cuyo análisis por homología reveló similitud con DivIVA, un iniciador de la división celular.

El gen *TTC1070* se situó junto a un transportador tipo ABC, una posible hidratasa implicada en la degradación de ácidos grasos y fosfolípidos, y una proteína hipotética que presentó similitud con fosfohidrolasas dependientes de metales de especies del género *Thermus* y *Deinococcus*.

En el caso de *TTC1185* sí se pudo observar cierta relación entre la función predicha y el contexto genético, ya que se situaba junto a una ribosa-fosfato pirofosfoquinasa, enzima que está implicada en la ruta de síntesis de purinas, a una S-ribosil homocisteinasa, proteína perteneciente a la familia de las nucleósido fosforilasas (Pugmire y Ealick, 2002) y a una proteína hipotética de función desconocida.

El gen *TTC1412* se situó junto a un elevado número de genes de pequeño tamaño cuya función estaba fundamentalmente asociada a la síntesis de la pared celular y lípidos de membrana, así como diferentes reductasas de función desconocida que no guardaban relación con la función predicha para éste.

El gen *TTC1491* se encontraba anotado como una posible antranilato fosforribosiltransferasa, una enzima implicada en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos que media la síntesis de *N*-(5-fosfo-D-ribosil) antranilato a partir de antranilato y 5-fosfo- $\alpha$ -D-ribosa 1-difosfato. A su vez, el antranilato es sintetizado por la antranilato sintasa, una enzima compuesta por una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ . En el caso de HB27, los genes que codificaban estas dos subunidades y el que codificaba la actividad predicha como antranilato fosforribosiltransfera se encontraban adyacentes en el genoma, constituyendo un agrupamiento de expresión, en el que también se incluía una esterasa de función desconocida.

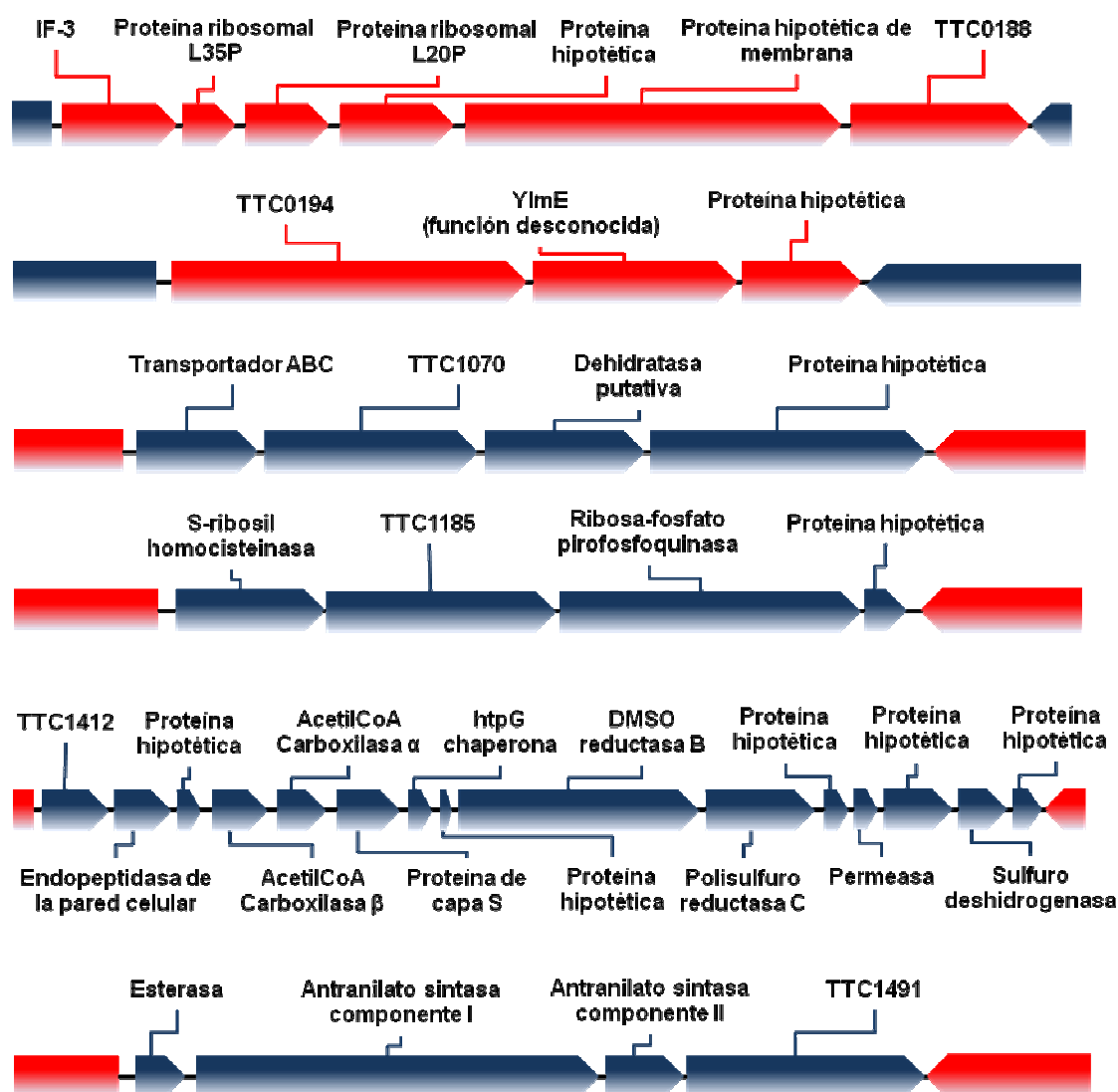


Figura 4.7 Contexto genético de los genes de *T. thermophilus* HB27 seleccionados para su clonación. En color rojo se indican los genes transcritos desde la hebra codificante y en azul los transcritos desde la hebra complementaria.

En general, el contexto genético de los genes seleccionados aportaba poca información acerca de su función fisiológica, lo que se veía agravado por el hecho de que la función de gran parte de los genes de HB27, o bien se infiere mediante herramientas de predicción, o bien resulta desconocida. Por lo tanto, se consideró necesario expresar dichos genes y comprobar su función *in vitro* para confirmar si poseían actividad NPasa.

#### 4.2.2 Clonación, expresión y purificación de posibles NPs de *T. thermophilus* HB27

Las enzimas se clonaron en el vector pGEM-T, que se encuentra linealizado y que posee una timina en 3' del sitio de clonación, lo que facilitó su ligación con los productos de

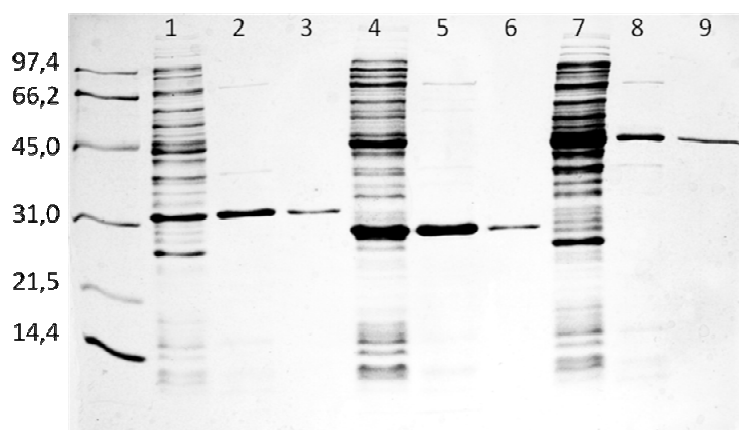
PCR obtenidos con la polimerasa Tth, que introduce una adenina en 3'. Las construcciones se transformaron con éxito en células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , y los fragmentos pertenecientes a los genes de interés se obtuvieron por doble digestión con NdeI y EcoRI, cuyas dianas se introdujeron mediante cebadores específicos en la PCR. Estos fragmentos se purificaron y ligaron adecuadamente en el vector pET22b, el cual permite la expresión de la proteína bien en su forma nativa, o bien añadiendo una cola terminal de histidinas para facilitar su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel. En este caso, dado que los genes iban a ser expresados en un sistema heterólogo de carácter mesófilo, lo que permite su purificación mediante desnaturalización diferencial por tratamiento de calor, la introducción de una cola de histidinas se consideró innecesaria, y se clonaron los genes en su forma silvestre.

Cinco de los seis genes se expresaron adecuadamente en células de *E. coli* BL21(DE3) y se observó un producto del tamaño esperado en los extractos inducidos, si bien el gen *TTC1185* no se consiguió expresar en el sistema seleccionado. Aunque no se pudo establecer una causa, se puede sugerir que ciertas interferencias en el plegamiento o toxicidad del producto podrían estar detrás de la ausencia de expresión. En cualquier caso, algunos estudios de genómica estructural con termófilos han revelado que entre el 20 y el 40% de las pautas de lectura abierta codificadas en estos microorganismos no pueden ser expresadas en *E. coli* (Jenney y Adams, 2008).

La purificación por el método de desnaturalización diferencial consiguió desnaturalizar gran parte de las proteínas del organismo hospedador, que, al agregar, permitieron su sedimentación por centrifugación, con lo que se obtuvo una fracción soluble enriquecida en el producto de expresión correspondiente con una pureza cercana al 40%.

La purificación de TTC0194, TTC1070 y TTC1412 por cromatografía de intercambio iónico permitió obtener valores de pureza cercanos al 90%.

En la figura 4.8 se ilustra una comparativa entre el grado de purificación obtenido por los diferentes métodos empleados. Como se puede apreciar en la imagen, la purificación por desnaturalización diferencial conduce a excelentes resultados, además de ser un método fácil, sencillo y escalable a grandes volúmenes. Por ello, y por el hecho de que el tratamiento térmico garantiza también la inactivación de enzimas que pudieran interferir en los ensayos, fue ésta la técnica elegida para obtener el biocatalizador empleado en subsiguientes ensayos de actividad.



**Figura 4.8 Purificación de TTC0194 (carriles 1-3), TTC1070 (carriles 4-6) y TTC1412 (carriles 7-9).** 1,4 y 7: extracto total; 2,5 y 8: purificación por desnaturalización diferencial; 3,6 y 9: purificación por intercambio iónico.

#### 4.2.3 Ensayos de actividad fosforilasa

Los productos de expresión obtenidos en el apartado anterior se sometieron a ensayos de prueba para la detección de actividad NPasa. Para llevar a cabo este estudio, se incubaron diferentes nucleósidos naturales con los extractos obtenidos tras la desnaturalización diferencial. Para ello se emplearon ribósidos y 2'-desoxirribósidos de todas las bases naturales (A, C, G, T, U) y se siguió la liberación de la base nitrogenada por fosforólisis del nucleósido.

Los resultados de estos ensayos iniciales se resumen en la tabla 4.1. TTC0194, TTC1070 y TTC1412 fueron capaces de romper el enlace N-glicosídico entre la pentosa y la base, lo que ponía de manifiesto especificidades claramente diferenciables y no superponibles. TTC0194 reconoció específicamente conjugados de 6-aminopurina (adenina) y TTC1070 de 6-oxopurinas (hipoxantina y guanina). Por otra parte, TTC1412 reconoció nucleósidos de uracilo y timina, pero no de citosina ni de purina. Las especificidades de estas tres enzimas resultaron no solapantes, abarcaron todos los nucleósidos naturales, excepto los conjugados de citosina, y en todos los casos presentaron mayor actividad frente a 2'-desoxirribosa. Las especificidades observadas fueron coherentes con la descripción de los productos génicos disponibles en la base de datos del genoma de HB27 (apartado 4.2.1) y explicaron la actividad sintética observada en el apartado 4.1.1 empleando células enteras, ya que una combinación de las tres enzimas sería capaz de llevar a cabo la transglicosilación de cualquier nucleósido, excepto de citosina, con selectividad hacia 2'-desoxirribosa. A pesar de que TTC1412 mostró especificidad hacia pirimidinas, fue incapaz de reconocer nucleósidos de citosina, según lo observado para todas las pirimidín nucleósido fosforilasas descritas hasta la fecha.



**Tabla 4.1 Fosforólisis de nucleósidos naturales empleando productos de expresión de *T. thermophilus* HB27.** Condiciones: sustrato 5 mM en tampón fosfato sódico 50 mM, pH= 7,0, extracto enzimático 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 30' a 65°C. Actividad expresada en porcentaje de nucleósido fosforolizado. N/D: no detectado.

Sustrato	TTC0188	TTC0194	TTC1070	TTC1412	TTC1491
Adenosina	N/D	24.2±0.2	N/D	N/D	N/D
2'-desoxiadenosina	N/D	27.8±0.4	N/D	N/D	N/D
Guanosina	N/D	N/D	8.7±0.1	N/D	N/D
2'-desoxiguanosina	N/D	N/D	22.5±0.3	N/D	N/D
Inosina	N/D	N/D	19.1±0.2	N/D	N/D
2'-desoxiinosina	N/D	N/D	40.5±0.3	N/D	N/D
Uridina	N/D	N/D	N/D	15.2±0.5	N/D
2'-desoxiuridina	N/D	N/D	N/D	40±1	N/D
Timidina	N/D	N/D	N/D	29.7±0.9	N/D
Citidina	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
2'-desoxicitidina	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

En contraposición, los productos de expresión TTC0188 y TTC1941 no mostraron actividad fosforolítica con ninguno de los sustratos empleados y, por lo tanto, se descartaron en subsiguientes ensayos.

De manera paralela, se llevaron a cabo controles con extractos de *E. coli* BL21(DE3) transformados con el plásmido pET22b vacío y sometidos al mismo tratamiento térmico de purificación. En ningún caso el fondo de proteína del organismo hospedador presente en la fracción soluble mostró actividad fosforolítica (datos no mostrados).

La reacción de fosforólisis catalizada por las NPs requiere de un ortofosfato libre que ataca el enlace N-glicosídico vía  $S_N2$  para liberar la base nitrogenada. Así pues, el empleo de tampón fosfato en estas reacciones no sólo cumple un papel de mantenimiento del pH sino de aporte de sustrato. Esta dependencia del anión fosfato para la fosforólisis del nucleósido distingue la actividad NPasa de la catalizada por las nucleosidasas que hidrolizan el enlace N-glicosídico y liberan una pentosa sin fosforilar en una reacción irreversible. Para comprobar si la liberación de la base nitrogenada observada con las enzimas TTC0194, TTC1070 y TTC1412 en estas reacciones se debía a una fosforólisis, atribuible a una NP, o a una hidrólisis catalizada por nucleosidasas, se repitieron las reacciones sustituyendo el tampón fosfato de la reacción por tris-HCl 50 mM, pH= 7,1. Además, para minimizar la presencia de fosfato en el extracto enzimático, las proteínas empleadas a tal fin se purificaron a partir de un nuevo cultivo inducido según el método descrito en el apartado 3.5.3 sustituyendo el tampón fosfato sódico

por el mismo tampón tris-HCl de la reacción. En estas reacciones, que se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones que las anteriormente descritas, no se detectó ninguna actividad (datos no mostrados).

#### 4.2.4 Ensayos de actividad sintasa

Otra característica que define la actividad catalizada por las NPs es la posibilidad de llevar a cabo la reacción de fosforólisis en sentido inverso, es decir, de realizar la síntesis de un nucleósido a partir de una base nitrogenada y una pentosa-1P.

En el apartado anterior se observó la capacidad de las proteínas TTC0194, TTC1070 y TTC1412 de llevar a cabo la fosforólisis de nucleósidos en una reacción dependiente de anión fosfato. Como siguiente paso se comprobó si las enzimas podían llevar a cabo la reacción en el sentido inverso, para lo cual se emplearon en ensayos de síntesis de nucleósidos a partir de bases nitrogenadas naturales y 2'-desoxirribosa-1P. Sin embargo, dado que éste último compuesto no es comercialmente accesible, la reacción hubo que acoplarla a la fosforólisis de un 2'-desoxinucleósido, que libera una molécula de 2'-desoxirribosa-1P. A tal fin se eligió la fosforólisis catalizada por TTC1412 tanto de la 2'-desoxiuridina como de la timidina (Figura 4.9), ya que previamente esta enzima mostró una buena actividad fosforolítica (Tabla 4.1).

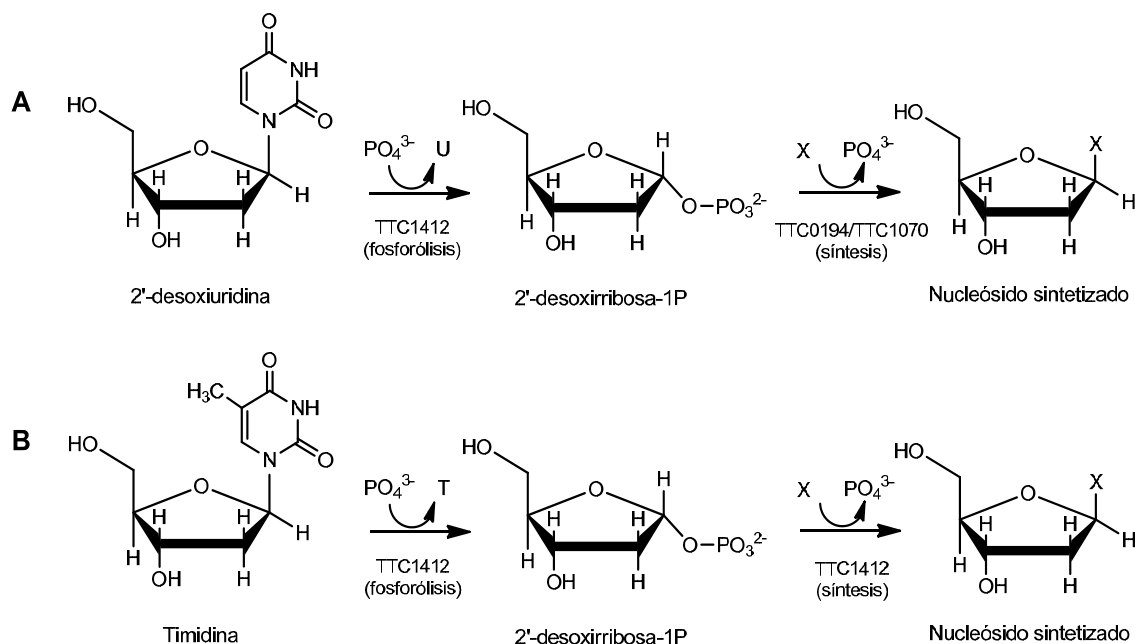


Figura 4.9 Esquema de la síntesis de nucleósidos empleando NPs de *T. thermophilus* HB27 acoplada a la fosforólisis de A) 2'-desoxiuridina y B) timidina. U= uracilo; T= timina; X= análogo de base aceptora.

Los resultados de los ensayos de síntesis se resumen en la tabla 4.2. Las enzimas fueron capaces de sintetizar nucleósidos y mostraron una especificidad idéntica a la exhibida en las reacciones de fosforólisis. Así, TTC0194 pudo sintetizar nucleósidos de adenina, TTC1070 de hipoxantina y TTC1412 de uracilo.

**Tabla 4.2 Síntesis de nucleósidos naturales empleando NPs de *T. thermophilus* HB27.** El residuo glicosídico transferido fue en todos los casos 2'-desoxirribosa obtenida por fosforólisis de 2'-desoxiuridina o timidina por TTC1412. Condiciones de la síntesis de nucleósidos empleando TTC0194 o TTC1070: 2'-desoxiuridina 5 mM, base aceptora 2,5 mM en tampón fosfato sódico 50 mM, pH= 7,0, extracto de TTC0194 o TTC1070 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , extracto de TTC1412 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 30' a 65°C. Condiciones de la síntesis de nucleósidos empleando TTC1412: timidina 5 mM, base aceptora 2,5 mM en tampón fosfato sódico 50 mM, pH= 7,0, extracto de TTC1412 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 30' a 65°C. Actividad expresada en porcentaje de base libre convertida en nucleósido. N/D: no detectado.

Base	TTC0194	TTC1070	TTC1412
Adenina	51.0 $\pm$ 0.4	N/D	N/D
Hipoxantina	N/D	42.0 $\pm$ 0.5	N/D
Uracilo	N/D	N/D	49 $\pm$ 1

La fosforólisis de nucleósidos dependiente de fosfato y la capacidad de utilizar la vía reversa para sintetizar nucleósidos sirvieron como confirmación de que TTC0194, TTC1070 y TTC1412 eran NPs genuinas. Siguiendo la clasificación propuesta por Pugmire y Ealick (Pugmire y Ealick, 2002), TTC0194 y TTC1070 se incluirían en el tipo-I mientras que TTC1412 se incluiría en el tipo-II, sin embargo, el perfil de especificidad mostrado por esta última, que acepta tanto timina como uracilo, así como ribosa y 2'-desoxirribosa no se corresponde con el de una uridina fosforilasa (UP) ni el de una timidina fosforilasa (TP), ambas pertenecientes al tipo-II, sino al de una pirimidín nucleósido fosforilasa (PyNP). Este tipo de NP, que se ha descrito en otras bacterias, como *Haemophilus influenza* (Scocca, 1971) y *Geobacillus stearothermophilus* (Okuyama y cols., 1996), reconoce todas las combinaciones de pentosa y pirimidina, a excepción de la citosina.

Debido a esto, TTC0194, TTC1070 y TTC1412 fueron renombradas como TtPNPII, TtPNPI y TtPyNP, respectivamente, siguiendo la nomenclatura empleada para las nucleósido fosforilasas del termófilo *G. stearothermophilus* (Okuyama y cols., 1996; Hamamoto y cols., 1997; Hamamoto y cols., 1997).

#### 4.2.5 Fosforólisis y síntesis de análogos de nucleósidos

Las enzimas, ya confirmadas como NPs, mostraron especificidades definidas y complementarias cuya función *in vivo* permite compartimentalizar el metabolismo de los diferentes nucleósidos naturales y sus respectivas bases nitrogenadas. Sin embargo, existen análogos de nucleósidos con interés farmacológico, que debido a su origen sintético no se encuentran en el interior de la célula, pero que aun así pueden ser reconocidos y transformados por estas enzimas. Para evaluar esta posibilidad, TtPNPI, TtPNPII y TtPyNP se emplearon en ensayos de fosforólisis y síntesis según los protocolos detallados en el apartado 3.5.5 utilizando sustratos no naturales con modificaciones en diferentes posiciones tanto de la base como del azúcar (Figura 4.10) a fin de determinar aquellas posiciones que admiten modificaciones por parte del centro de reconocimiento de la enzima.

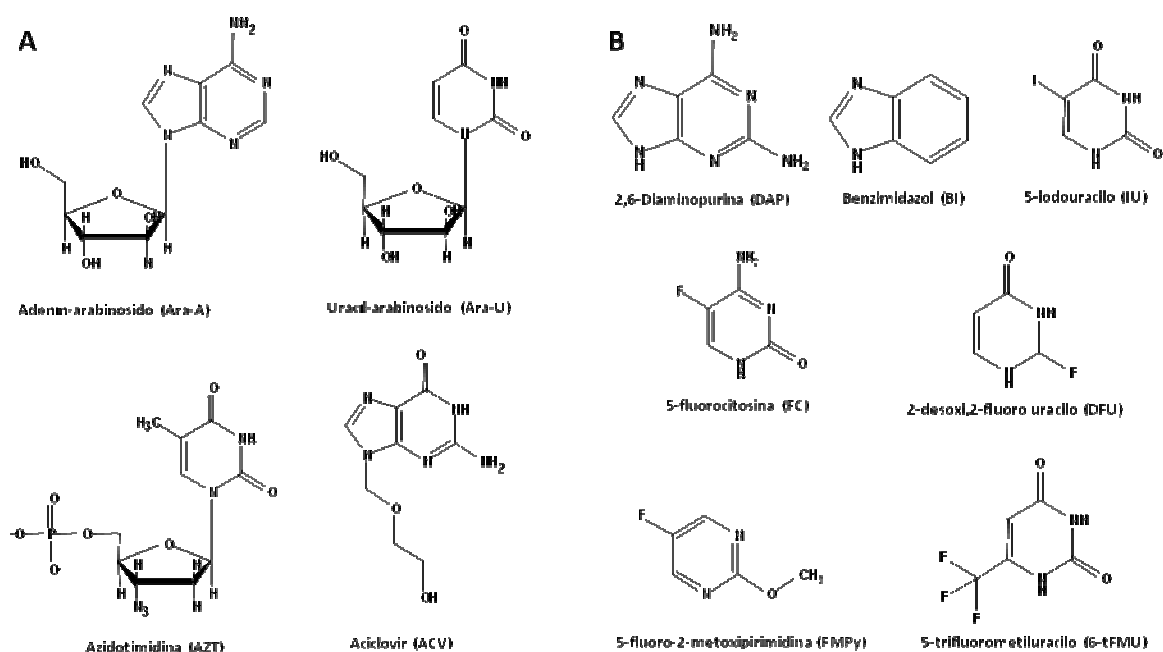
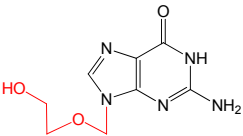
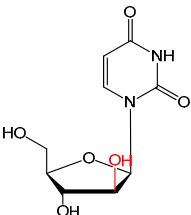
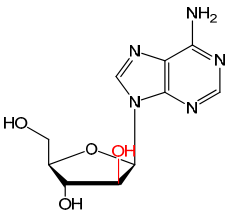
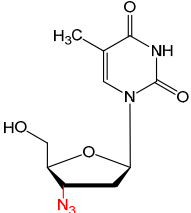


Figura 4.10 Sustratos sintéticos empleados en ensayos de A) fosforólisis y B) síntesis empleando NPs de *T. thermophilus* HB27.

Los resultados de estos ensayos pusieron de relieve un fuerte requerimiento estructural en el azúcar por parte de las tres enzimas. Así, TtPNPI no fue capaz de llevar a cabo la fosforólisis de aciclovir (Tabla 4.3) a pesar de que previamente se demostró su capacidad para reconocer nucleósidos de guanina (Tabla 4.1), por lo que la ausencia de actividad se debía atribuir a la cadena abierta que sustituye a la pentosa en este compuesto. Del mismo modo, TtPyNP fue incapaz de romper el enlace N-glicosídico entre la timina y la 2'-desoxi,3'-azido,5'-fosforribosa del AZT (Tabla 4.3). En contraposición, TtPNPII y TtPyNP sí fueron capaces de

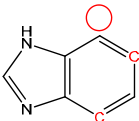
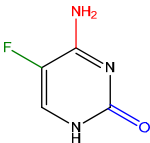
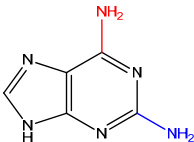
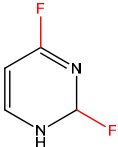
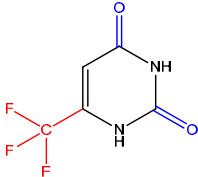
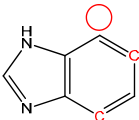
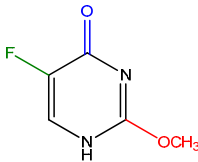
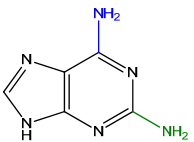
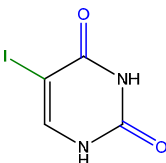
llevar a cabo la fosforólisis de *ara-A* y *ara-U*, isómeros de la 2'-desoxiadenosina y la 2'-desoxiuridina, respectivamente. Sin embargo, la configuración  $\alpha$  del grupo hidroxilo en 2' que presenta la arabinosa (en contraposición con la 2'- $\beta$ -desoxirribosa) tuvo un fuerte impacto negativo sobre la actividad, obteniendo un 1.0 y 3.2% de conversión con *ara-A* y *ara-U*, respectivamente (Tabla 4.3), frente al 27,8 y 40,0% obtenidos con los isómeros naturales 2'-desoxiadenosina y 2'-desoxiuridina, respectivamente (Tabla 4.1).

**Tabla 4.3 Actividad fosforolítica de NPs de *T. thermophilus* sobre análogos de nucleósidos.** Condiciones: sustrato 5 mM en tampón fosfato sódico 50 mM, pH= 7,0, extracto enzimático 5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 30' a 65°C. Valores de fosforólisis expresados en porcentaje de nucleósido fosforolizado. N/D: no detectado. Las diferencias estructurales entre el análogo y el sustrato natural aceptado por la enzima correspondiente se destacan en rojo. Acrónimos de acuerdo con los establecidos en la Figura 4.10.

Enzima	Sustrato	Estructura	Fosforólisis	Enzima	Sustrato	Estructura	Fosforólisis
TtPNPI	ACV		N/D	TtPyNP	<i>ara-U</i>		3.2 $\pm$ 0.1
TtPNPII	<i>ara-A</i>		1.0 $\pm$ 0.1	TtPyNP	AZT		N/D

Los ensayos de síntesis empleando bases análogas revelaron una importante influencia de las sustituciones en el anillo de purina y pirimidina sobre la actividad enzimática. Así, sustratos sin ninguna modificación, como el BI, no fueron reconocidos por TtPNPI ni TtPNPII (Tabla 4.4) a pesar de poseer una estructura isómera clásica de una base purínica. TtPNPII fue capaz de llevar a cabo la síntesis de 2,6-diaminopurín-2'-desoxirribosa a partir de DAP (Tabla 4.4) con rendimientos similares a los obtenidos con adenina (Tabla 4.2), lo que pone de manifiesto cierta flexibilidad de la enzima para reconocer adeninas 2-sustituídas. TtPNPI fue incapaz de reconocer éste sustrato, cuya diferencia con su sustrato natural, guanina, radica en la sustitución del grupo 6-oxo por una amina (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4 Síntesis de nucleósidos empleando bases no naturales como aceptor.** El residuo glicosídico transferido fue en todos los casos 2'-desoxirribosa obtenida por fosforólisis de 2'-desoxiuridina o timidina por TTC1412. Condiciones de la síntesis de nucleósidos empleando TTC0194 o TTC1070: 2'-desoxiuridina 5 mM, base aceptora 2,5 mM en tampón fosfato sódico 50 mM, pH= 7,0, extracto de TTC0194 o TTC1070 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , extracto de TTC1412 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 30' a 65°C. Condiciones de la síntesis de nucleósidos empleando TTC1412: timidina 5 mM, base aceptora 2,5 mM en tampón fosfato sódico 50 mM, pH= 7,0, extracto de TTC1412 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 30 min. a 65°C. Valores de síntesis expresados en porcentaje de base libre convertida en nucleósido. N/D: no detectado. Las diferencias estructurales entre el análogo y el sustrato natural aceptado por la enzima correspondiente se destacan en rojo cuando tienen un efecto negativo sobre la actividad y en verde cuando son aceptados por la enzima. Un círculo rojo indica la ausencia de un grupo requerido para el reconocimiento del sustrato. En color azul se indican los residuos implicados en la especificidad de sustrato de la enzima. Acrónimos de acuerdo con los establecidos en la Figura 4.10.

Enzima	Base aceptora	Estructura	Síntesis	Enzima	Base aceptora	Estructura	Síntesis
TtPNPI	BI		N/D	TtPyNP	5-FC		N/D
TtPNPI	DAP		N/D	TtPyNP	DFU		N/D
				TtPyNP	6-tFMeU		N/D
TtPNPII	BI		N/D	TtPyNP	FMPy		N/D
TtPNPII	DAP		41.7±1.5	TtPyNP	5-IU		47.8±1.1

En lo que se refiere a TtPyNP, la sustitución o eliminación de los grupos 2-oxo y 4-oxo del anillo de pirimidina, característicos de uracilo y timidina, abolió el reconocimiento del sustrato, tal como demostró la ausencia de síntesis cuando se empleó como aceptor 5-FC, DFU o FMPy (Tabla 4.4). Algunas sustituciones sobre posiciones no esenciales, como la del análogo 6-tFMeU, tampoco fueron aceptadas (Tabla 4.4). No obstante, cuando el sustrato se encontraba modificado en la posición 5, la enzima sí fue capaz de reconocerlo, observándose valores de conversión con 5-IU (Tabla 4.4) muy similares a los obtenidos con uracilo (Tabla 4.2).

#### 4.2.6 Optimización de los parámetros de reacción en la fosforólisis de nucleósidos

A fin de determinar los parámetros óptimos de reacción de las NPs de *T. thermophilus* HB27, se llevaron a cabo ensayos de fosforólisis de nucleósidos naturales en diferentes condiciones de temperatura, acidez y concentración del tampón fosfato.

Se observó una influencia directa de la concentración del tampón fosfato sobre la actividad de las tres enzimas (Figura 4.11A) atribuible a la estequiometría de la reacción, que precisa de un anión ortofosfato por molécula de nucleósido fosforolizado. Así, cuando se empleó tampón fosfato 50 mM, lo que implica una proporción entre fosfato y nucleósido de 10:1, se obtuvieron valores óptimos de conversión, con un incremento de entre el 25% y el 50% sobre los obtenidos empleando una relación molar 1:1, dependiendo de la enzima. Las concentraciones de fosfato superiores a 50 mM no tuvieron más efecto en la actividad de TtPNPI y TtPNPII, pero afectaron negativamente a la de TtPyNP y provocaron un descenso de la actividad por encima de esta concentración, con una caída del 80% cuando se empleó una concentración de 200 mM, es decir, cuatro veces por encima de la óptima.

La influencia del pH sobre la actividad mostró un rango sin máximo definido y situado en la región ácida en el que las enzimas permanecieron activas, en concordancia con lo observado con las células enteras (Figura 4.6). El pH óptimo se observó entre 4,0 y 6,0 (más ácido que el observado con células enteras) para TtPNPI y TtPNPII (Figura 4.11B). A pH < 4.0 la actividad descendió bruscamente y por debajo de pH = 3.0 las enzimas se desactivaron completamente. TtPyNP exhibió mayor sensibilidad al pH y su máximo de actividad se observó entre 5,0 y 6,0 (Figura 4.11B).

Por último, se observó una influencia directa de la temperatura sobre la actividad, si bien las tres enzimas exhibieron una notable resistencia a las variaciones de temperatura con respecto a la óptima de crecimiento del microorganismo de origen. En uno de los extremos, las tres enzimas fueron activas a 95°C (Figura 4.11C), en el límite del punto de ebullición del agua. La variación de la actividad frente a la temperatura mostró una tendencia lineal hasta los 85°C, punto en el que el incremento de la actividad experimentó una ligera aceleración, si bien no se pudo determinar una temperatura óptima de actividad debido a las limitaciones técnicas que impone la medición a temperaturas superiores a la ebullición del agua en medio acuoso. En el otro extremo del rango de temperaturas, las tres enzimas se mostraron activas a temperaturas inferiores a la de crecimiento de *T. thermophilus* HB27 (65°C), y retuvieron aproximadamente un 50% de actividad cuando la reacción transcurrió a 50°C, una temperatura que se sitúa a 15-20°C por debajo de la temperatura óptima de *T. thermophilus* HB27.

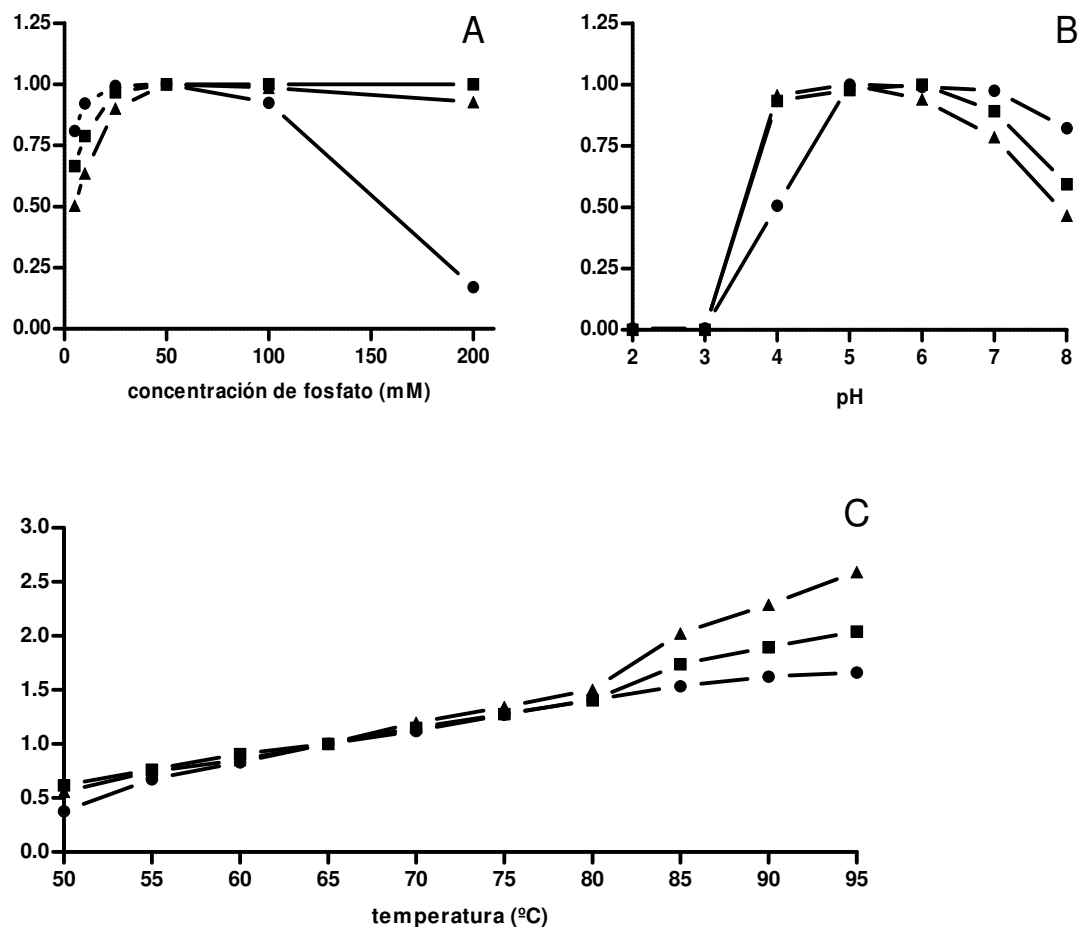


Figura 4.11 Optimización de A) concentración del tampón fosfato sódico, B) acidez y C) temperatura de reacción de la actividad nucleósido fosforilasa de (■) TtPNPI, (▲) TtPNPII y (●) TtPyNP. Condiciones del valor central: nucleósido 5 mM en tampón fosfato sódico 50 mM, pH= 7,0, extracto enzimático 5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 30' a 65°C.

Esta flexibilidad de trabajo en rangos de temperatura desde los 50°C hasta los 95°C de las tres enzimas se consideró una de las características más reseñables de cara a su aplicación práctica. Además, las tres enzimas mostraron una notable capacidad para trabajar bajo diferentes condiciones de temperatura, pH y fuerza iónica y, si bien se observaron ciertas diferencias en la influencia que estos parámetros ejercieron sobre cada enzima, se pudo alcanzar un compromiso para establecer unos valores comunes para los parámetros analizados. Esas condiciones únicas se aplicaron en subsiguientes ensayos enzimáticos al constituir un punto en común que nos permitió el empleo simultáneo de dos enzimas en una misma reacción de síntesis en condiciones óptimas o cuasióptimas:

Tampón: Fosfato sódico 50 mM, pH = 7.0. A pesar de que el valor de pH elegido no se corresponde estrictamente con un máximo de actividad en ninguna de las enzimas, éstas retuvieron entre un 80% y un 95% de actividad bajo estas condiciones, las cuales permiten



trabajar a pH neutro dentro del rango de tamponamiento del tampón fosfato, esencial para el desarrollo de la reacción de fosforólisis.

Temperatura: 80°C. Esta temperatura permitió observar una buena actividad enzimática mientras se mantenían condiciones de trabajo aceptables para los diferentes equipos empleados en los ensayos.

#### 4.2.7 Determinación de los parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos de la fosforólisis catalizada por TtPNPI, TtPNPII y TtPyNP se determinaron para sus correspondientes sustratos naturales a 80°C (Tabla 4.5). Las tres enzimas mostraron cinéticas michaelianas y los valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$  se obtuvieron por interpolación en un diagrama Lineweaver-Burk. Las tres enzimas mostraron unos valores de eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) mayores para 2'-desoxirribósidos que para ribósidos, mientras que los valores de  $K_m$  revelaron, sorprendentemente, una mayor especificidad hacia ribósidos, en contraste con los menores valores de conversión observados anteriormente con éstos (Tabla 4.1).

**Tabla 4.5** Parámetros cinéticos de NPs de *T. thermophilus* calculados a 80°C. <sup>a</sup> mM; <sup>b</sup> s<sup>-1</sup>; <sup>c</sup> s<sup>-1</sup> · mM<sup>-1</sup>.

	TtPNPI			TtPNPII			TtPyNP		
	$K_m^a$	$k_{cat}^b$	$k_{cat}/K_m^c$	$K_m^a$	$k_{cat}^b$	$k_{cat}/K_m^c$	$K_m^a$	$k_{cat}^b$	$k_{cat}/K_m^c$
Guanosina	0.53±0.01	296±2	558.8	-	-	-	-	-	-
2'-desoxiguanosina	1.01±0.03	830±6	822.5	-	-	-	-	-	-
Inosina	2.08±0.02	173±2	83.2	-	-	-	-	-	-
2'-desoxiinosina	2.06±0.02	627±6	304.3	-	-	-	-	-	-
Adenosina	-	-	-	0.32±0.02	440±3	1376.5	-	-	-
2'-desoxiadenosina	-	-	-	0.36±0.03	563±4	1563.5	-	-	-
Uridina	-	-	-	-	-	-	0.12±0.01	202±6	1683.3
2'-desoxiuridina	-	-	-	-	-	-	0.36±0.3	562±17	1561.1
Timidina	-	-	-	-	-	-	0.42±0.02	400±12	952.4

La determinación de la energía de activación se llevó a cabo utilizando 2'-desoxiguanosina, 2'-desoxiadenosina y 2'-desoxiuridina como sustrato para TtPNPI, TtPNPII y TtPyNP, respectivamente. Se determinaron los valores de  $k_{cat}$  a 60°C, 70°C, 80°C y 90°C, y se representaron sus logaritmos neperianos frente a la inversa de la temperatura (representación de Arrhenius, Figura 4.12). Los puntos experimentales se ajustaron por regresión lineal y la energía de activación se obtuvo a partir de la pendiente de la recta:

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \left( \frac{1}{T} \right)$$

Donde:

k = constante de la reacción

A = factor pre-exponencial

E<sub>a</sub> = energía de activación

R = constante universal de los gases ideales, y equivale a 8,314472 J.K<sup>-1</sup> .mol<sup>-1</sup>

T = temperatura absoluta expresada en grados Kelvin

Siendo -E<sub>a</sub>/R la pendiente de la recta.

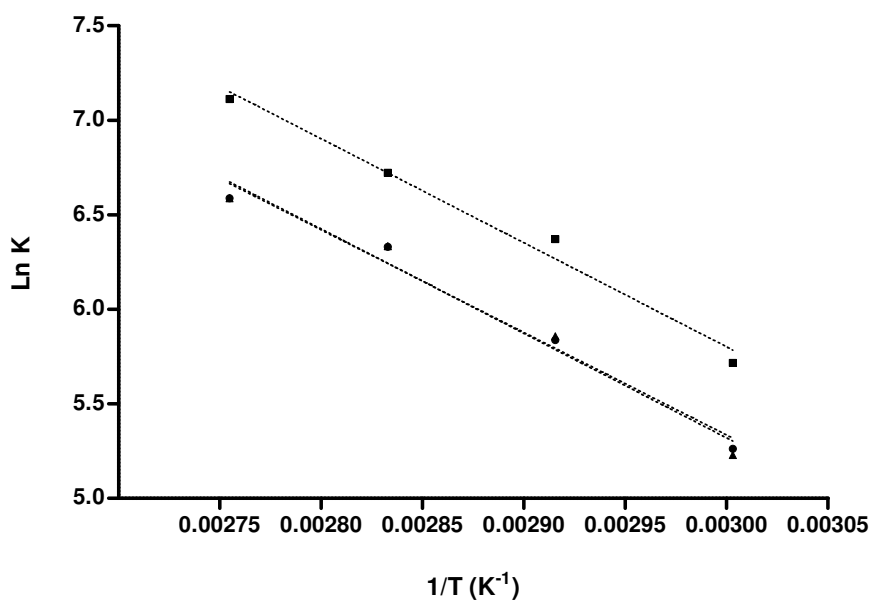


Figura 4.12 Representación de Arrhenius de (■) TtPNPI, (▲) TtPNPII y (●) TtPyNP.

Las energías de activación calculadas para TtPNPI, TtPNPII y TtPyNP fueron de 45,8 kJ.mol<sup>-1</sup>, 45,9 kJ.mol<sup>-1</sup> y 45,1 kJ.mol<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos valores sugieren que las enzimas actúan mediante un estado de transición semejante al de los sustratos. De los valores de la ordenada en el origen (ln A) se obtuvo el factor de colisiones (A) que es una medida del número de colisiones efectivas por unidad de tiempo. Este valor se relaciona con la actividad enzimática y la accesibilidad del centro activo y/o de reconocimiento. Los valores obtenidos para A fueron:

	lnA	A(s <sup>-1</sup> )
TtPNPI	22,3	4,9 10 <sup>9</sup>
TtPNPII	21,9	3,2 10 <sup>9</sup>
TtPyNP	21,6	2,4 10 <sup>9</sup>

A partir de estos datos se puede justificar la mayor actividad ( $k_{cat}$  alta) y menor especificidad ( $K_m$  alta) de TtPNPI respecto a su sustrato comparado con TtPNPII (Tabla 4.5), ya que presenta un mayor valor para el factor de colisiones.

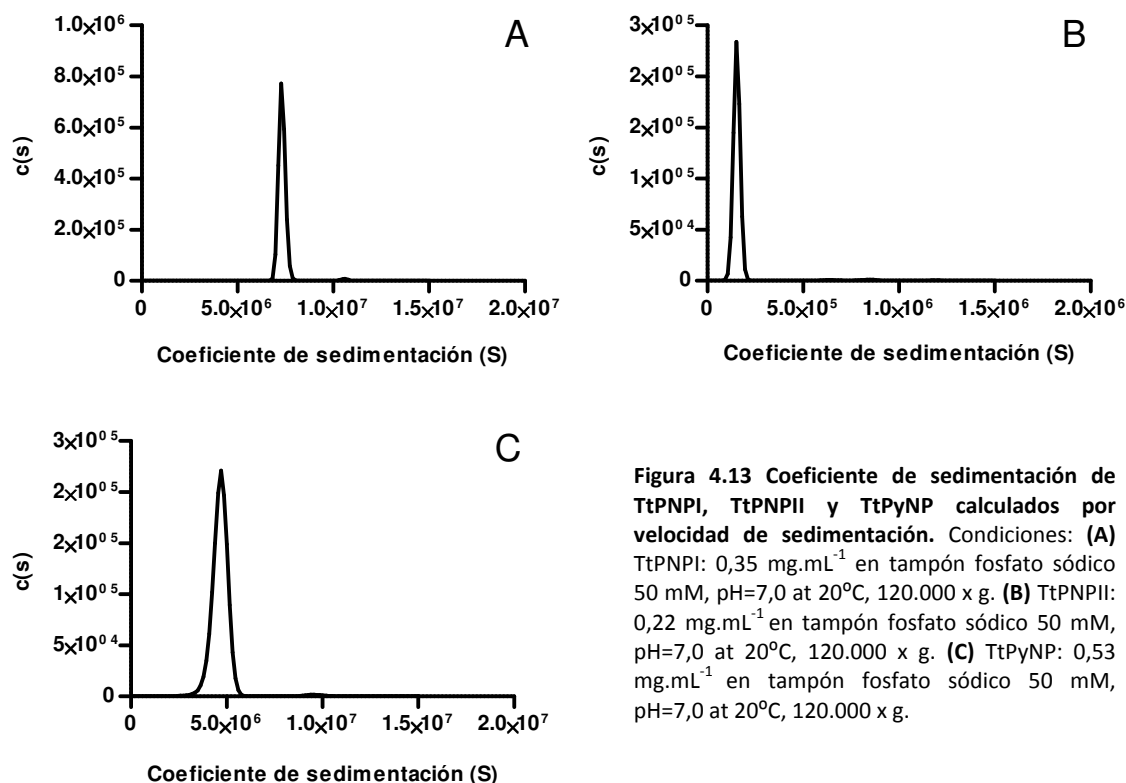
#### 4.2.8 Determinación de la estructura cuaternaria

Dado que la estabilidad de una enzima se relaciona con su estructura, y que TtPNPI, TtPNPII y TtPyNP son enzimas cuya purificación no se había descrito previamente, se consideró de interés determinar su configuración oligomérica, deducida a partir de la masa molecular del complejo. Para ello se llevaron a cabo dos tipos de análisis por ultracentrifugación analítica con el objeto de determinar el estado oligomérico de las NPs de *T. thermophilus* HB27: velocidad de sedimentación y equilibrio de sedimentación. Las muestras de proteína empleadas en estos análisis se purificaron de acuerdo con el método descrito en el apartado 3.5.4 a fin de evitar interferencia por proteínas de *E. coli* contaminantes.

##### 4.2.8.1 Velocidad de sedimentación

En el estudio realizado mediante la técnica de velocidad de sedimentación, las proteínas de la muestra se someten a campos centrífugos elevados, lo que se traduce en un desplazamiento neto de las mismas hacia el fondo de la celda. Este desplazamiento, que depende de la masa, densidad y forma de la macromolécula, permite determinar el número de especies presentes en una muestra evaluando el número de impurezas o de diferentes estados oligoméricos de una proteína en una muestra.

Los resultados indicaron una gran homogeneidad de las tres muestras, en las que se observó un pico atribuible a la existencia de una única especie macromolecular (Figura 4.13), por lo que el nivel de impurezas detectado se consideró aceptable en todos los casos.

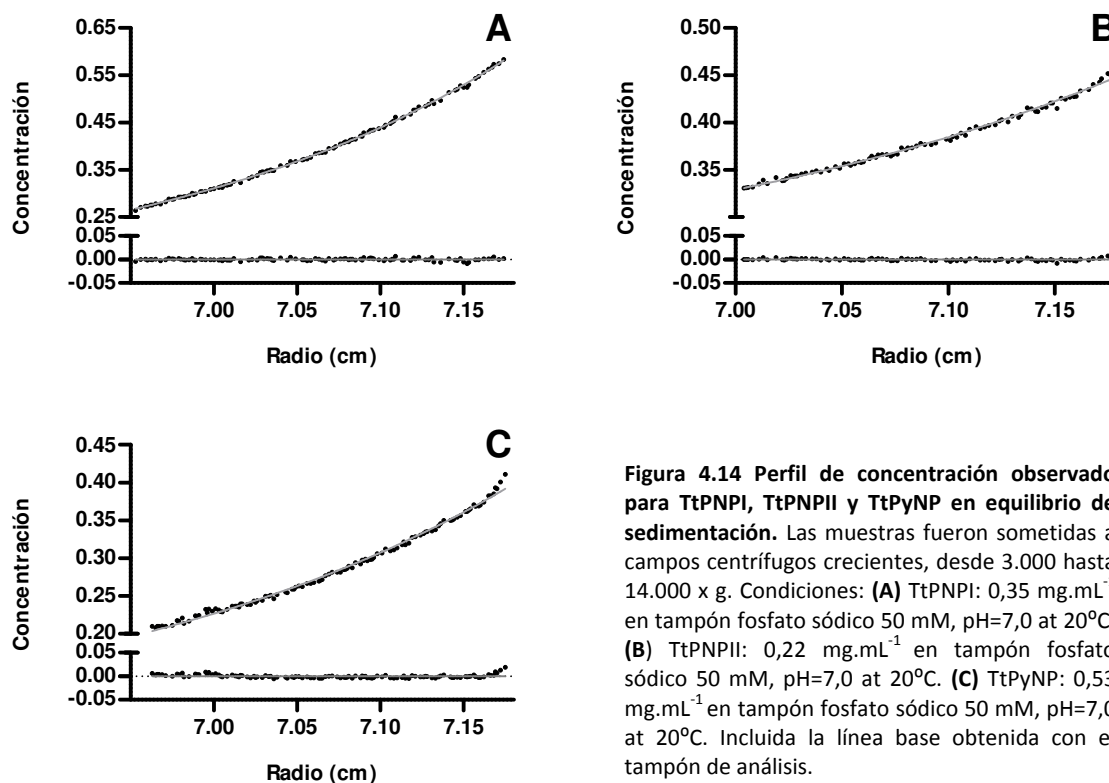


**Figura 4.13** Coeficiente de sedimentación de TtPNPI, TtPNPII y TtPyNP calculados por velocidad de sedimentación. Condiciones: **(A)** TtPNPI:  $0,35 \text{ mg.mL}^{-1}$  en tampón fosfato sódico 50 mM, pH=7,0 at  $20^\circ\text{C}$ ,  $120.000 \times g$ . **(B)** TtPNPII:  $0,22 \text{ mg.mL}^{-1}$  en tampón fosfato sódico 50 mM, pH=7,0 at  $20^\circ\text{C}$ ,  $120.000 \times g$ . **(C)** TtPyNP:  $0,53 \text{ mg.mL}^{-1}$  en tampón fosfato sódico 50 mM, pH=7,0 at  $20^\circ\text{C}$ ,  $120.000 \times g$ .

#### 4.2.8.2 Equilibrio de sedimentación

En el estudio por equilibrio de sedimentación, las muestras se someten a campos centrífugos más bajos en los que, eventualmente, se alcanza un equilibrio entre la sedimentación y la difusión, que se anulan mutuamente. El gradiente de concentración resultante depende únicamente de la masa molar de las macromoléculas, la cual se puede calcular a partir de los datos experimentales: conociendo la masa molar teórica de los monómeros se puede determinar la configuración oligomérica de la proteína nativa.

Los perfiles de concentración observados en los tres casos (Figura 4.14) permitieron la determinación de la masa molar boyante, y, tras la corrección de las misma por el volumen específico de la proteína y la densidad del tampón, se calculó su masa molar:  $156 \pm 1$ ,  $30 \pm 0$  y  $73 \pm 1$  kDa para TtPNPI, TtPNPII y TtPyNP, respectivamente. Estos datos fueron compatibles con un modelo hexamérico para TtPNPI (masa teórica del monómero: 25 kDa) y monomérico para TtPNPI (masa teórica del monómero: 30 kDa). En el caso de TtPyNP, la masa molar observada (73 kDa) fue inferior a la que se correspondería con la de un dímero ( $2 \times 45 \text{ kDa} = 90 \text{ kDa}$ ) debido a la presencia residual de una especie contaminante de bajo peso molecular; no obstante, la bondad del ajuste a un modelo dimérico se consideró aceptable.



**Figura 4.14 Perfil de concentración observado para TtPNPI, TtPNPII y TtPyNP en equilibrio de sedimentación.** Las muestras fueron sometidas a campos centrífugos crecientes, desde 3.000 hasta 14.000 x g. Condiciones: **(A)** TtPNPI: 0,35 mg.mL<sup>-1</sup> en tampón fosfato sódico 50 mM, pH=7,0 at 20°C. **(B)** TtPNPII: 0,22 mg.mL<sup>-1</sup> en tampón fosfato sódico 50 mM, pH=7,0 at 20°C. **(C)** TtPyNP: 0,53 mg.mL<sup>-1</sup> en tampón fosfato sódico 50 mM, pH=7,0 at 20°C. Incluida la línea base obtenida con el tampón de análisis.

### CAPÍTULO 3. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE TtPNPI, TtPNPII Y TtPyNP. FORMULACIÓN DE UN MODELO CATALÍTICO DE TtPyNP Y MODIFICACIÓN DE SU ESPECIFICIDAD POR EVOLUCIÓN DIRIGIDA

En el presente capítulo se aborda el estudio estructural y conformacional de las NPs purificadas en el capítulo anterior con el objeto de caracterizar su centro activo. El conocimiento acerca del mecanismo catalítico que proporciona esta información es muy valioso a la hora de abordar su manipulación orientada a la mejora del biocatalizador, bien sea por modificación de su regio-/estereoselectividad o de su termoestabilidad. En este capítulo se aborda el estudio conformacional por espectroscopía de las tres NPs y la mejora de la especificidad de TtPyNP hacia nucleósidos de arabinosa mediante técnicas de evolución dirigida.

#### 4.3.1 Estudios conformacionales

Las técnicas de espectroscopía disponibles permiten analizar diferentes aspectos estructurales que aportan información acerca del estado de la proteína, como fenómenos de

desplegamiento, movimientos de apertura/cierre o cambios en sus estructuras secundarias. En este apartado se utilizó la técnica de espectroscopía de fluorescencia para relacionar cambios en sus niveles de actividad con alteraciones en la estructura producidos por una serie de efectores.

#### 4.3.1.1 Influencia de la temperatura y los cationes divalentes sobre la actividad

Se seleccionaron tres efectores en función de su capacidad para alterar la conformación global o local de una proteína:

Temperatura: Posee un efecto global sobre la conformación. Un aumento de la temperatura conlleva un aumento de la energía cinética del sistema, lo que se traduce en una mayor flexibilidad de la enzima. Cuando la temperatura sobrepasa un límite, establecido individualmente para cada proteína, los enlaces intra e intermoleculares se interrumpen, los residuos hidrofóbicos del núcleo se exponen al medio acuoso, la proteína se desnaturaliza y, como consecuencia, pierde su función.

Cationes divalentes: El calcio y el magnesio se encuentran en disolución acuosa en forma de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ). Estos cationes establecen en la proteína complejos con las moléculas de agua y los aminoácidos con carga negativa, mientras que otros aminoácidos con exceso de carga positiva como Lys o Arg presentan poca afinidad por estos cationes alcalinotérreos. Los complejos iónicos formados por uno u otro tienen diferentes propiedades geométricas, ya que el  $\text{Mg}^{2+}$  establece complejos planocuadrados con un fuerte carácter iónico, mientras que el  $\text{Ca}^{2+}$  forma complejos octaédricos (Figura 4.15). La formación de complejos con residuos de la proteína provoca distorsiones locales que, si se producen en el entorno del centro activo o del centro de reconocimiento, afectan a la actividad enzimática.

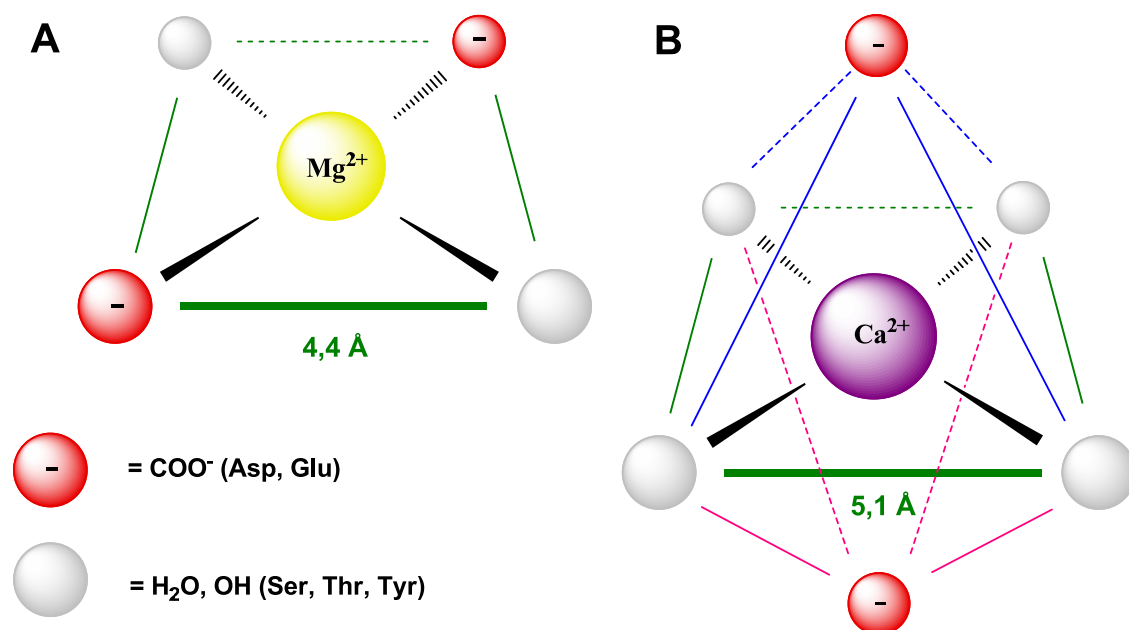


Figura 4.15 Complejos iónicos formados por A)  $Mg^{2+}$  y B)  $Ca^{2+}$ .

Para estudiar el efecto de las alteraciones conformacionales sobre la actividad enzimática de las NPs de *T. thermophilus* se llevaron a cabo reacciones de fosforólisis bajo la influencia de estos tres efectores.

De acuerdo con lo observado en la Figura 4.11C, el aumento de la temperatura se correlacionó con un aumento de la actividad en todos los casos (Figura 4.16A), mientras que un aumento en las concentraciones de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  llevaron a la pérdida de actividad en todos los casos (Figuras 4.16B y C). Las enzimas TtPNPI y TtPNPII fueron menos sensibles al aumento de la concentración de estos cationes que TtPyNP, cuya actividad se redujo en un 50% en presencia de  $Ca^{2+}$  20 mM y en un 75% en presencia de  $Mg^{2+}$  30 mM.

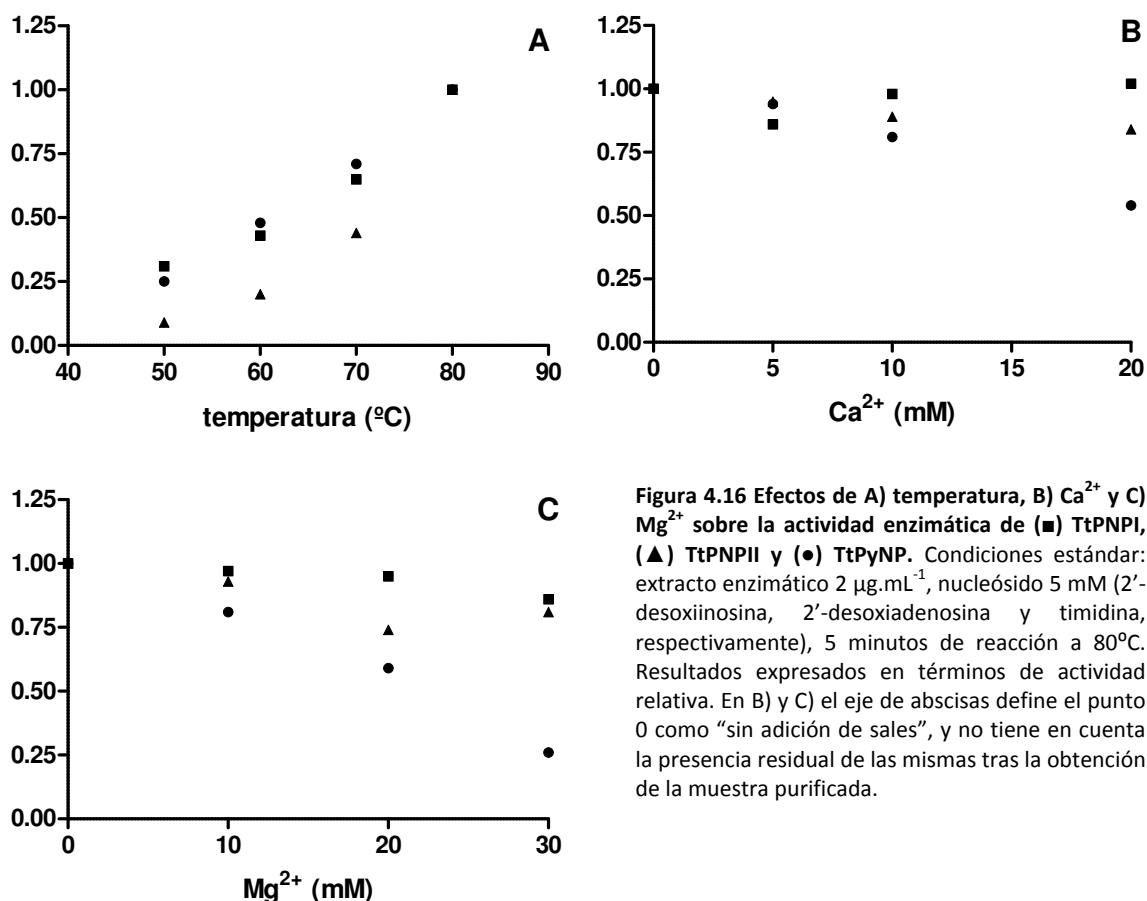


Figura 4.16 Efectos de A) temperatura, B) Ca<sup>2+</sup> y C) Mg<sup>2+</sup> sobre la actividad enzimática de (■) TtPNPI, (▲) TtPNPII y (●) TtPyNP. Condiciones estándar: extracto enzimático 2 µg.mL<sup>-1</sup>, nucleósido 5 mM (2'-desoxiinosina, 2'-desoxiadenosina y timidina, respectivamente), 5 minutos de reacción a 80°C. Resultados expresados en términos de actividad relativa. En B) y C) el eje de abscisas define el punto 0 como "sin adición de sales", y no tiene en cuenta la presencia residual de las mismas tras la obtención de la muestra purificada.

#### 4.3.1.2 Espectroscopía de fluorescencia

Se registraron los espectros de emisión de las muestras entre 300 y 400 nm (longitud de onda de excitación = 280 nm). En estas condiciones de análisis espectroscópico, la contribución mayoritaria a la emisión de fotones la realiza el triptófano, lo que permite observar cambios en su entorno (exposición al disolvente, ionización, colisión, etcétera). Estos cambios permiten determinar indirectamente el estado global de una proteína cuando ésta sufre modificaciones en su conformación.

El aumento de la temperatura se asoció en todos los casos con un descenso de la intensidad de fluorescencia (hipocromía), sin que se observara desplazamiento del máximo de emisión con ninguna de las enzimas (Figura 4.17). Al aumentar la temperatura de un sistema, las moléculas aumentan su energía cinética y se produce un mayor número de choques intramoleculares. Estos choques relajan parte de la energía de excitación de los triptófanos, lo que implica que, durante su relajación hasta el estado fundamental, el número de fotones emitidos es menor, es decir, disminuye la intensidad de la fluorescencia. En el caso de que la



proteína perdiera su estructura por efecto de la temperatura, los triptófanos se expondrían al disolvente, lo que en un espectro de fluorescencia se reflejaría como una variación en la longitud de onda de emisión máxima (ver a continuación), un fenómeno que no se observó en este caso. Por lo tanto, se dedujo que el aumento de la temperatura se traducía en un aumento de la flexibilidad de las proteínas sin pérdida organizativa por desnaturalización, de acuerdo con la actividad enzimática detectada anteriormente (Figura 4.16A).

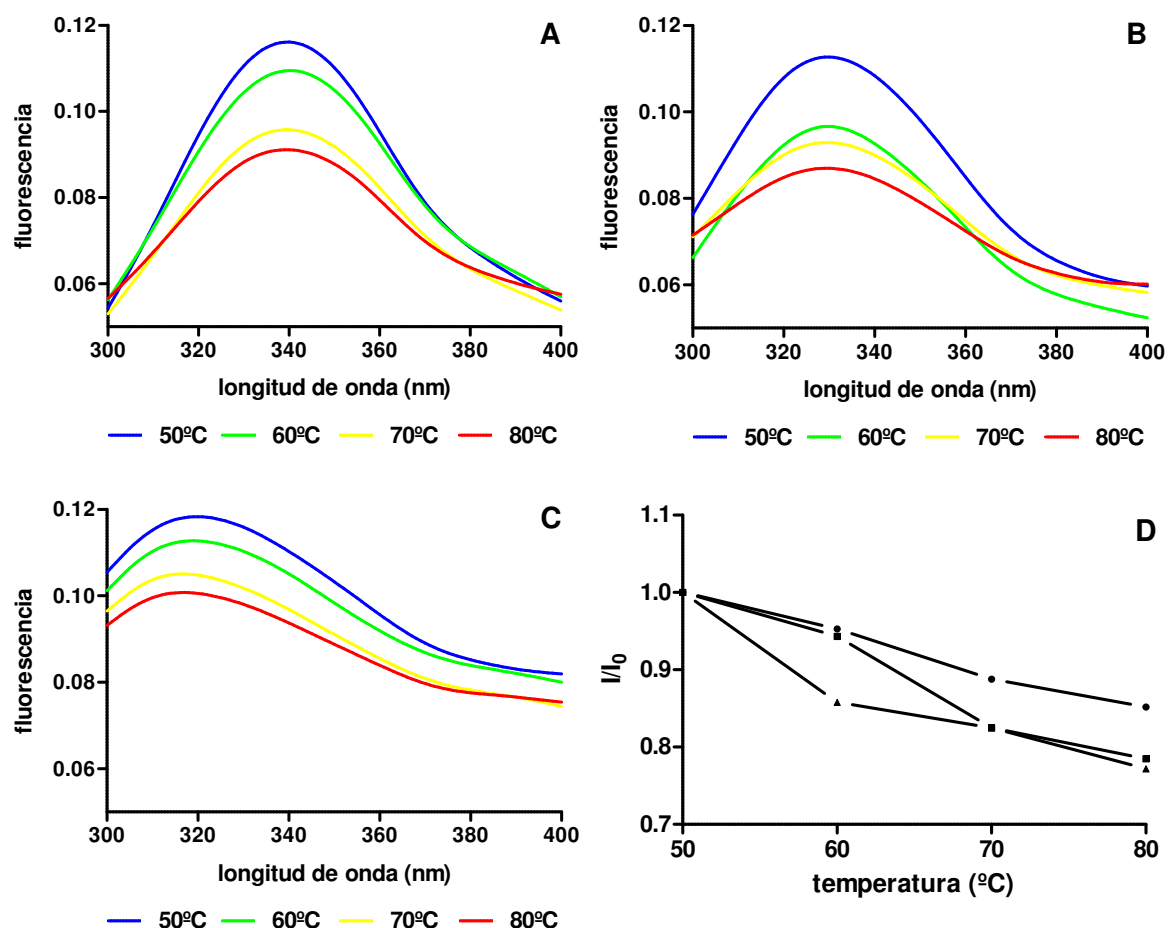


Figura 4.17 Influencia del aumento de la temperatura en los espectros de emisión de A) TtPNPI, B) TtPNPII y C) TtPyNP. D) Relación de la intensidad de emisión inicial ( $I_0$ ) y la intensidad observada ( $I$ ) en los máximos de emisión de los espectros de (■) TtPNPI, (▲) TtPNPII y (●) TtPyNP.

El aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se tradujo en un aumento en la intensidad de emisión en el caso de TtPNPI y TtPNPII (Figura 4.18A, B), mientras que TtPyNP sufrió un desplazamiento de su máximo de emisión hacia el rojo (batocromía) sin variación significativa en la intensidad de emisión (Figura 4.18C). La batocromía indica un cambio en el estado de ionización del fluoróforo que se produce cuando éste pasa de un entorno hidrofóbico, como el núcleo de la proteína, a uno polar, atribuible al disolvente. En el desplazamiento del máximo

de emisión de TtPyNP se observó un desdoblamiento del pico cuando al alcanzar una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de 20 mM, lo que indicaría que al menos un triptófano de los tres que posee la enzima estaría expuesto al solvente, mientras que otra subpoblación vería su entorno inalterado. Este fenómeno se asociaría presumiblemente con el descenso en la actividad por debajo del 50% observado con anterioridad en TtPyNP (Figura 4.16B).

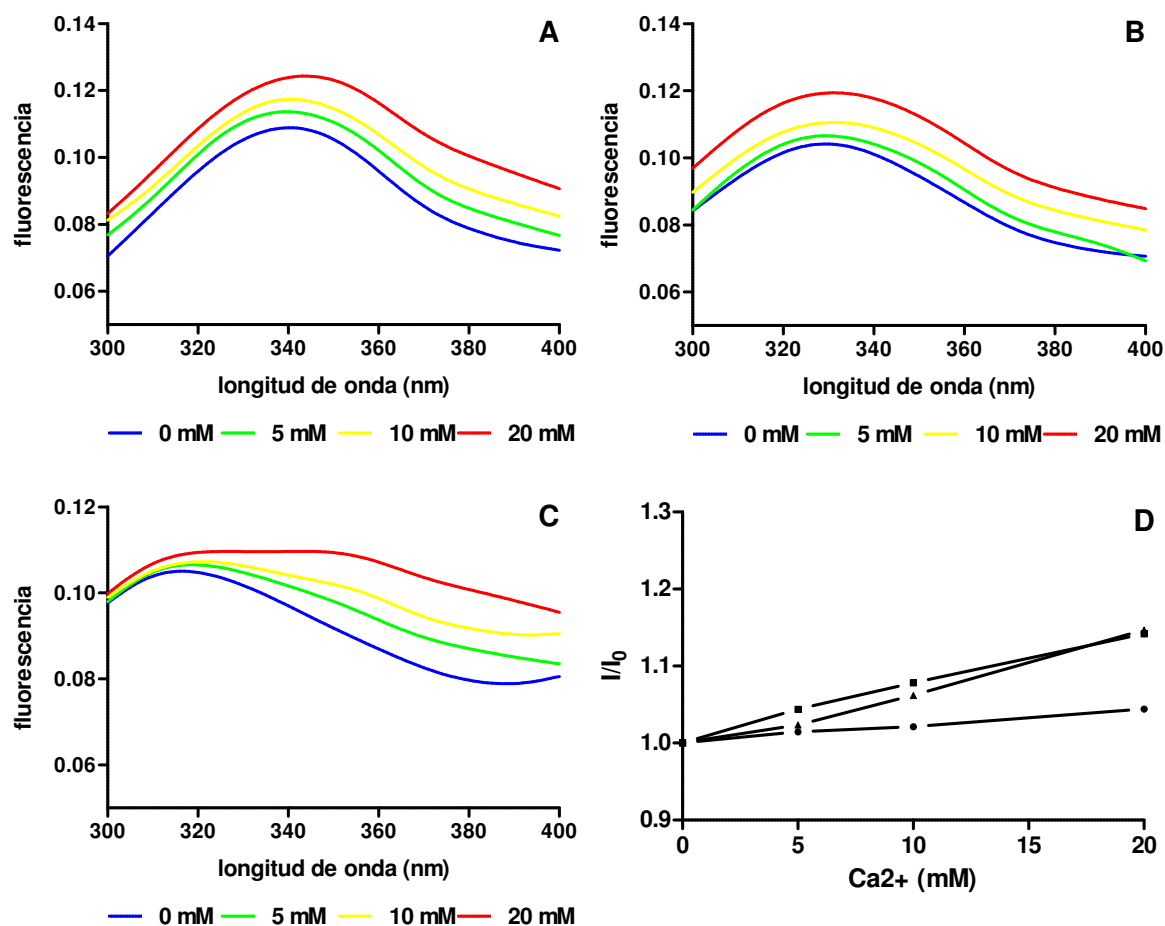


Figura 4.18 Influencia del aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en los espectros de emisión de A) TtPNPI, B) TtPNPII y C) TtPyNP. D) Relación de la intensidad de emisión inicial ( $I_0$ ) y la intensidad observada ( $I$ ) en los máximos de emisión de los espectros de (■) TtPNPI, (▲) TtPNPII y (●) TtPyNP.

Por último, el incremento de la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  tuvo un efecto similar a los observados con  $\text{Ca}^{2+}$  sobre los espectros registrados: efecto hipercrómico en TtPNPI y TtPNPII (Figura 4.19A, B) y batocromía sin variación en la intensidad en TtPyNP (Figura 4.19C). De estos datos se dedujo que el catión  $\text{Mg}^{2+}$  también establecía un complejo con residuos de TtPyNP, y, aunque los espectros mostraron variaciones conformacionales menos acusadas que en el caso del  $\text{Ca}^{2+}$ , debido seguramente a la distinta manera en la que ambos cationes establecen

complejos, la distorsión generada tuvo un efecto más acusado en el descenso de la actividad enzimática de TtPyNP (Figura 4.16C).

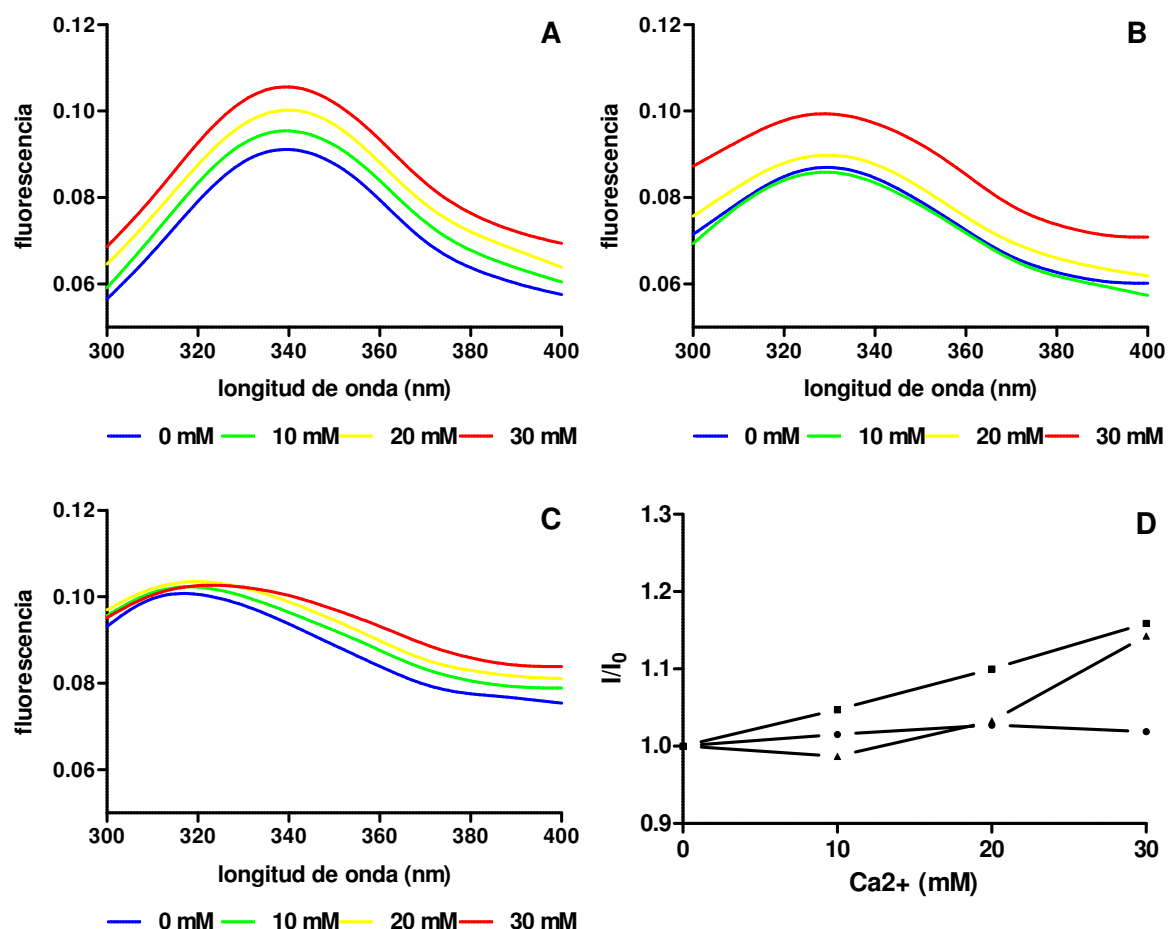


Figura 4.19 Influencia del aumento de la concentración del catión  $Mg^{2+}$  en los espectros de emisión de A) TtPNPI, B) TtPNPII y C) TtPyNP. D) Relación de la intensidad de emisión inicial ( $I_0$ ) y la intensidad observada ( $I$ ) en los máximos de emisión de los espectros de (■) TtPNPI, (▲) TtPNPII y (●) TtPyNP.

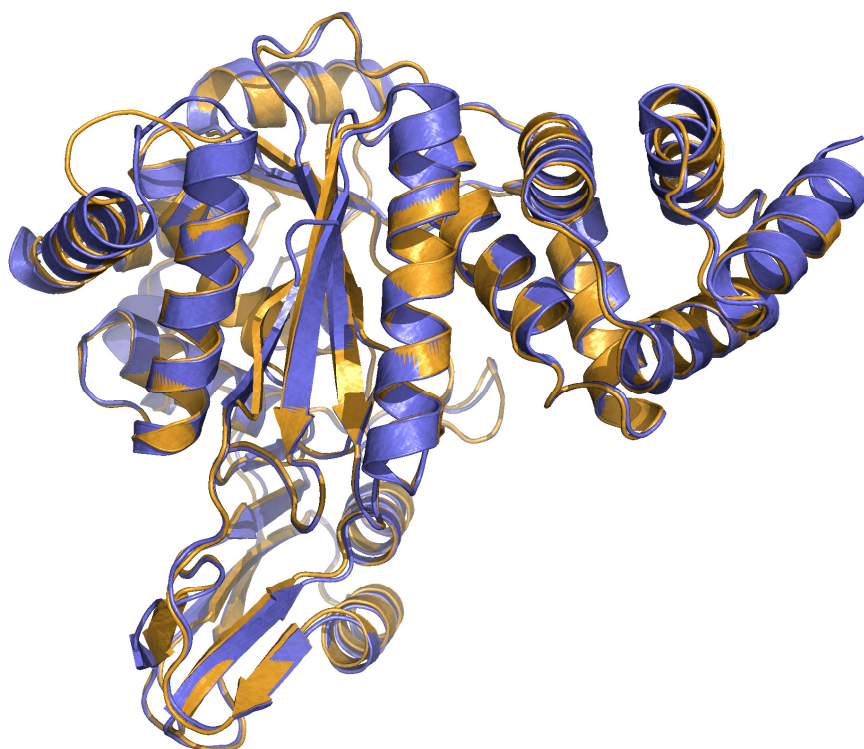
En general, los resultados del análisis por espectroscopía de fluorescencia indicaron un aumento de la flexibilidad conformacional sin pérdida de la estructura nativa cuando las enzimas se calentaron desde  $50^{\circ}C$  hasta  $80^{\circ}C$ , y también pusieron de manifiesto que los complejos formados por los cationes  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  introducen una alteración conformacional, más acusada en TtPyNP, que resulta en un descenso de la función catalítica y que indica la exposición de al menos un triptófano al disolvente.

#### 4.3.2 Modificación de la especificidad de TtPyNP mediante la metodología de evolución dirigida

En el apartado 4.2.7 se mostró la limitada capacidad de TtPyNP para el reconocimiento y fosforólisis de nucleósidos conjugados con arabinosa. Debido a las propiedades terapéuticas que poseen este tipo de compuestos, empleados en la actualidad como agentes antitumorales, la disponibilidad de enzimas para su síntesis tiene especial interés en el campo de la biocatálisis, por lo que se decidió abordar la mejora de su especificidad frente a arabinosa mediante evolución dirigida. Sin embargo, la técnica empleada para tal fin, conocida como CASTing, requiere un conocimiento de la estructura tridimensional de la enzima, así como la mayor información posible acerca de su mecanismo catalítico. Debido a la ausencia de una estructura resuelta de TtPyNP y a la consiguiente falta de información acerca de la configuración de su centro activo, como paso previo fue necesario realizar un modelado por homología sobre una estructura ya existente, a fin de indagar en las bases que determinan su especificidad de base y azúcar. La evolución dirigida de TtPyNP se llevó a cabo en las instalaciones del Max-Planck Institut für Kohlenforschung (Mülheim an der Ruhr, Alemania) como parte de una estancia científica bajo la supervisión del Prof. Manfred T. Reetz.

##### 4.3.2.1 Modelado por homología

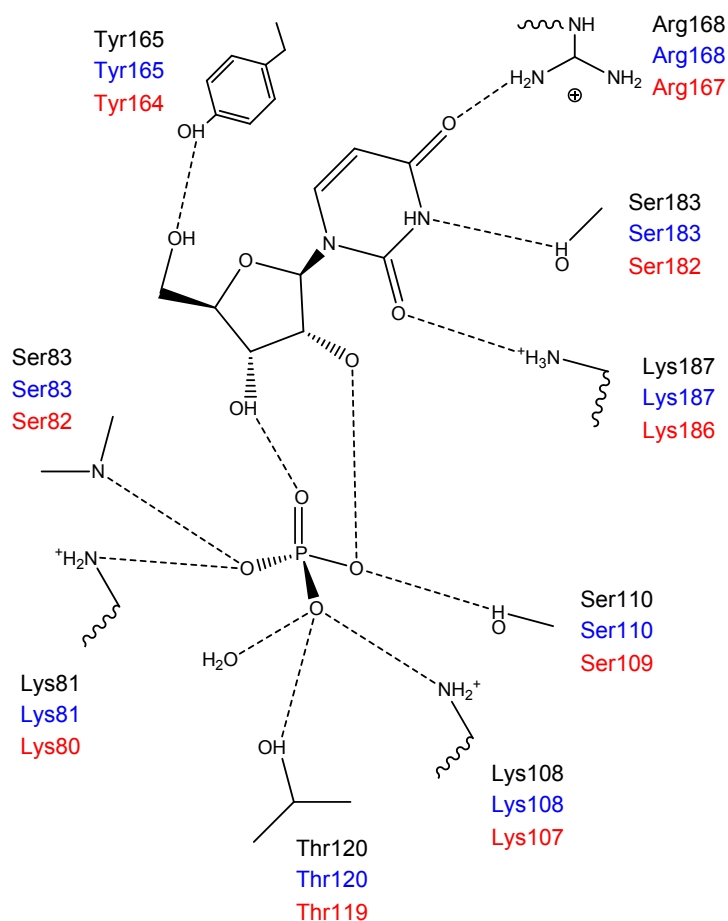
En primer lugar se llevó a cabo la búsqueda de una estructura molde adecuada para el modelado basándose en dos criterios: primero, que estuviera cristalizada con una molécula de ligando unida al centro activo que permitiera obtener un modelo en conformación cerrada así como información acerca de los residuos implicados en la unión proteína-ligando, y, segundo, poseer la mayor identidad de secuencia con TtPyNP posible. De acuerdo a estos criterios, se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos del Protein Data Bank (PDB) y se seleccionó como molde la estructura de la PyNP de *Staphylococcus aureus* (código PDB 3H5Q, resolución 1,94 Å), que posee una molécula de timidina y una molécula de sulfato (como análogo del anión fosfato) unidos al sitio de reconocimiento de nucleósido y fosfato, respectivamente, y que comparte una identidad de secuencia del 43% con TtPyNP. El modelado se realizó según el método descrito en el apartado 3.10.2, con el que se obtuvo un modelo con un valor Z de -0,627, lo que el programa calificó como “bueno”, y el espacio de la celda se completó con H<sub>2</sub>O. Tanto el modelo de TtPyNP como el molde de *S. aureus* mostraron una correcta superposición de todas las estructuras secundarias, variando tan sólo la orientación de algunos de sus bucles (Figura 4.20).



**Figura 4.20** Superposición de la estructura tridimensional de un monómero de la PyNP de *Staphylococcus aureus* (azul) y el modelo de TtPyNP generado a partir de ésta (naranja).

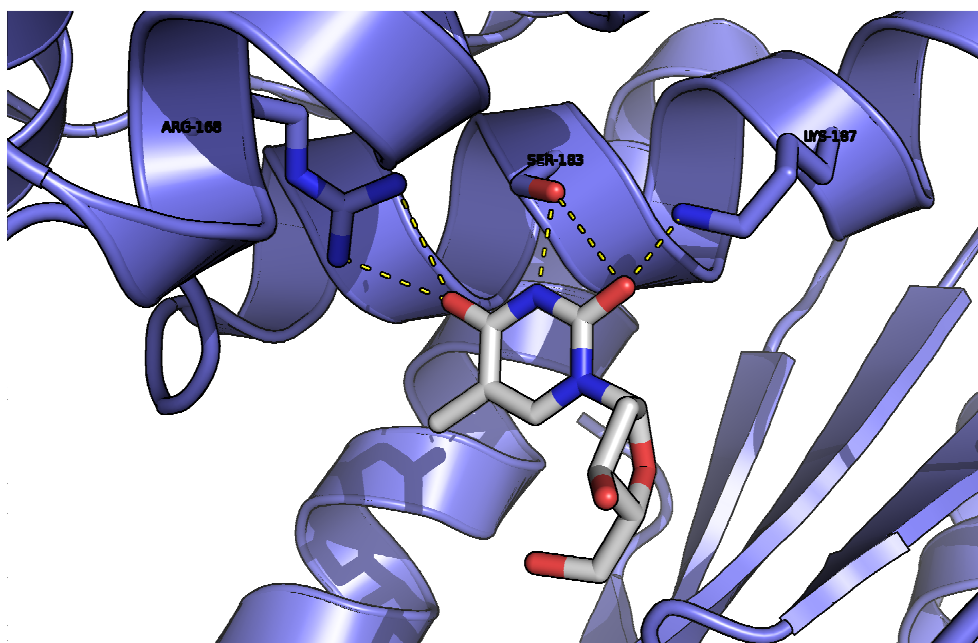
#### 4.3.2.2 Generación de un modelo estructural y catalítico de TtPyNP

A pesar de la falta de información acerca del mecanismo catalítico de TtPyNP, Pugmire y Ealick describieron el de su homólogo en *E. coli*, así como los residuos implicados en la unión de los sustratos (Pugmire y Ealick, 2002). Esta proteína presenta dos dominios de unión, uno para el fosfato y otro para el nucleósido. El reconocimiento de éste último está mediado por interacción de dos residuos básicos (arginina y lisina) y una serina con la base nitrogenada. Esta unión produce un desplazamiento parcial de cargas que debilita el enlace N-glicosídico, lo que favorece el desplazamiento del azúcar por parte del fosfato (Figura 4.21). Tras analizar su secuencia, la PyNP de *S. aureus*, anteriormente empleada como molde, reveló una fuerte conservación tanto en la identidad como en la posición de los residuos de reconocimiento (Figura 4.21), así como en su orientación en la estructura tridimensional, en la que se encuentran unidos una molécula de timidina y una de sulfato, como análogo del anión fosfato (Figuras 4.22A y B).



**Figura 4.21 Mecanismo catalítico de la PyNP de *Escherichia coli*, detallando los residuos implicados (negro) y sus correspondencias en la PyNP de *Staphylococcus aureus* (azul) y TtPyNP (rojo).** Los residuos Arg168, Ser183 y Lys187 establecen puentes de hidrógeno con el anillo de pirimidina, generando un desplazamiento parcial de cargas que debilita el enlace N-glicosídico. El fosfato, cuya unión al sitio catalítico está mediada por los residuos Ser83, Lys 81, Thr120, Ser110 y una molécula de H<sub>2</sub>O, realiza un ataque nucleófilo sobre el enlace que resulta en una sustitución de la base conjugada con inversión (sustitución tipo S<sub>N</sub>2). La función de la Tyr165 no es conocida, pero se le atribuye la unión al nucleósido por apilamiento en T. Modificada de Pugmire y Ealick (Pugmire y Ealick, 2002).

A



B

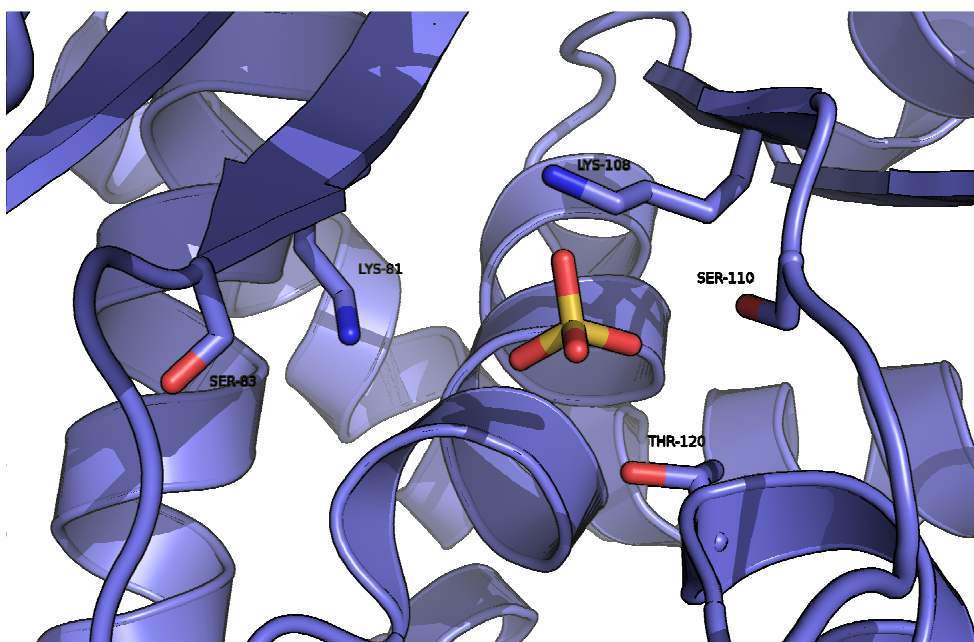
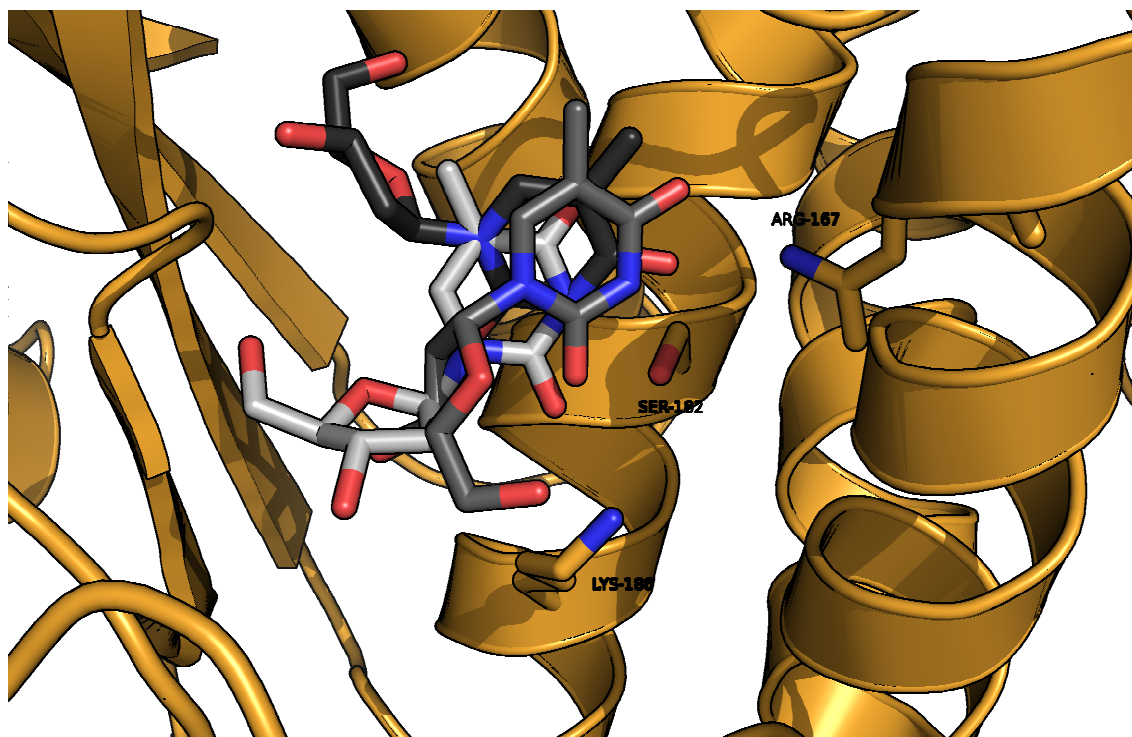


Figura 4.22 Unión de A) timidina y B) anión sulfato a los sitios de unión del nucleósido y el fosfato, respectivamente, en el caso de la PyNP de *Staphylococcus aureus* cristalizada (código PDB 3H5Q, resolución 1,94 Å). Las líneas punteadas indican unión por enlace de hidrógeno.

Esta conservación también se observó en la secuencia de TtPyNP, en la que se encontraron los mismos aminoácidos con un desfase en la posición de -1 (Figura 4.21). Además, las simulaciones de *docking* molecular con una molécula de timidina sobre el área equivalente al dominio de unión del nucleósido del modelo permitieron la correcta orientación del sustrato (Figura 4.23). Estos datos sugirieron que el mecanismo catalítico, así como los residuos implicados, serían comunes en las PyNP de *E. coli*, *S. aureus* y *T. thermophilus* HB27, y, a su vez, estarían de acuerdo con lo observado en los espectros de fluorescencia descritos en el apartado 4.3.1, ya que, junto al residuo Arg167, existe una  $\alpha$ -hélice donde se ubica Trp41 en posición cercana a la superficie.





**Figura 4.23** Docking molecular de una molécula de timidina al sitio de unión del nucleósido en el modelo de TtPyNP obtenido a partir de la PyNP de *Staphylococcus aureus*. Se recogen las tres mejores posiciones obtenidas en base a su correcta alineación con los posibles residuos catalíticos Arg167, Ser168 y Lys186, indicadas por el empleo de diferentes escalas de grises para la molécula de timidina.

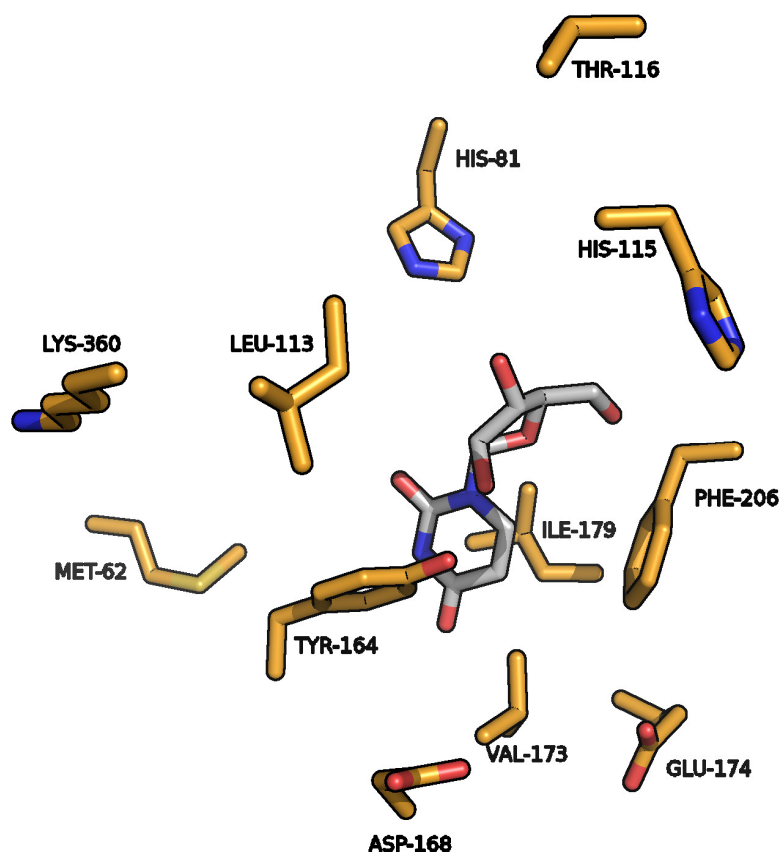
#### 4.3.2.3 Selección de residuos por CASTing

La técnica elegida en la selección de residuos para su mutación, orientada a la mejora de la especificidad de TtPyNP frente a *ara*-U, fue la denominada *Combinatorial Active-centre Saturation Test*, o CASTing, desarrollada por el grupo del Dr. Reetz (Reetz y Carballeira, 2007), la cual impone una restricción racional del número de residuos que posteriormente serán sustituidos por mutagénesis, lo que reduce notablemente el esfuerzo en la evaluación de las librerías de mutantes. El CASTing se fundamenta en la delimitación de una esfera de 9-10 Å de radio que se traza utilizando como centro la coordenada en el espacio que ocupa la molécula de ligando en la estructura tridimensional de la enzima, asumiéndose que la aportación a la especificidad de los residuos que entran dentro de dicha esfera será mayor que aquellos que quedan fuera de ella.

El modelo generado en el apartado 4.3.2.1 permitió la aplicación de esta técnica sobre TtPyNP, a partir de la posición de unión de la timina al centro activo, aproximándola mediante *docking* molecular (Figura 4.23). Para ello, se trazó una esfera de 9 Å de radio alrededor del ligando y se seleccionó un total de 15 aminoácidos cuyas cadenas laterales quedaban



englobadas en ella. Los residuos Arg168, Ser183 y Lys187, incluidos inicialmente en la selección, se descartaron, ya que, como se describió anteriormente, son los responsables del reconocimiento de la base nitrogenada (Figura 4.21), y la pérdida o alteración de los mismos interferiría en la búsqueda de mutantes positivos en el reconocimiento de arabinosa, la cual constituye la porción glucosídica del nucleósido. Una vez descartados los residuos catalíticos, se seleccionaron 12 aminoácidos para su sustitución (Figura 4.24).



**Figura 4.24 Selección de residuos por CASTing en la elaboración de librerías de mutantes para el aumento de especificidad de TtPyNP frente a *ara*-U.** Se trazó una esfera de 9 Å de radio a partir de una molécula de timidina, y se seleccionaron aquellos aminoácidos cuyas cadenas laterales quedaban englobados dentro de ésta, siendo excluidos los catalíticos.

#### 4.3.2.4 Creación de librerías de mutantes por ISM

La técnica elegida para la generación de las librerías de variantes de estas posiciones fue la *Iterative Saturation Mutagenesis* (ISM). Esta técnica se basa en la amplificación por PCR de la construcción vector-gen de interés empleando oligonucleótidos con tripletes degenerados en las posiciones seleccionadas por CASTing. A la hora de llevar a cabo la ISM hay que considerar dos factores determinantes para el desarrollo experimental: el tipo de

degeneración de los tripletes y el número de residuos por librería para los que se generarán variantes.

El tipo de degeneración permite definir cuántos aminoácidos diferentes pueden sustituir a la posición original. Así, hay degeneraciones que restringen las sustituciones hacia residuos ácidos/básicos, residuos polares, apolares, o bien hacia cualquier aminoácido.

Igualmente, el número de residuos mutados por librería, así como la diversidad de las sustituciones introducidas por el triplete degenerado, afectan al esfuerzo que requiere la evaluación de las mismas. De este modo, una librería que contiene un mutante sencillo, si se emplea degeneración NNK, requiere el análisis de 94 colonias para cubrir con un 95% de probabilidades las 20 posibles sustituciones que ofrece esta degeneración; para un doble mutante este número asciende a 3066 colonias, y, para los triples mutantes, a 98163. Por lo tanto, es importante decidir si se prefiere favorecer la rapidez del experimento mediante mutantes sencillos o bien aumentar las probabilidades de éxito mediante la introducción de dobles o triples mutantes con acción sinérgica, aunque a costa de períodos más largos de trabajo.

Para el diseño experimental de la generación de librerías se utilizó la aplicación CASTER (Reetz y Carballeira, 2007), que calcula el esfuerzo de evaluación en función de estos dos parámetros. La degeneración seleccionada fue NNK ( $N = A, C, G, T$ ;  $K = T, G$ ), ya que permite obtener sustituciones por los 20 aminoácidos, lo que cubre todas las posibilidades de polaridad, tamaño, carga, etc. En cuanto al número de mutantes por librería, y debido a las restricciones de tiempo impuestas por la duración de la estancia, se optó por la generación de librerías con mutantes sencillos. De esta manera, se generaron 12 librerías (una por cada posición seleccionada por CASTing, apartado 4.3.2.3) de 94 colonias cada una.

#### 4.3.2.5 Evaluación de las librerías

La evaluación de los mutantes se llevó a cabo según el método descrito en el apartado 3.5.5.4 y 3.6. Las reacciones se realizaron en placas multipocillo, cuya última columna se reservó para la enzima silvestre, a modo de control negativo. Las condiciones experimentales se diseñaron para permitir una fosforólisis de aproximadamente el 10% del *ara*-U por parte de las especies silvestres. De esta manera se estableció suficiente margen para poder observar tanto una posible mejora como una posible pérdida de la actividad fosforolítica a causa de las mutaciones introducidas.

En 10 de las 12 posiciones evaluadas, la introducción de mutantes resultó deletérea para la actividad de la enzima (Tabla 4.6). Esta susceptibilidad frente a la variación de estas posiciones sugirió que, a pesar de ser residuos que no juegan un papel catalítico, resultan esenciales para la función. De hecho, el alineamiento de la secuencia de TtPyNP frente a homólogos pertenecientes a especies tanto cercanas como separadas en la filogenia reveló una fuerte conservación de estos residuos (Figura 4.25), los cuales podrían poseer una funcionalidad estructural con una organización espacial seleccionada a lo largo de la evolución. Por otra parte, en las librerías Met62 y Lys360, que durante el CASTing fueron las posiciones que se situaron más alejadas del centro de la esfera, se observaron mutantes positivos, si bien el aumento observado en la actividad fue moderado. La variante M62L mostró un incremento de la actividad de un 10% frente a la especie silvestre, mientras que las variantes K360T, K360I y K360D presentaron un aumento de actividad del 36, 34 y 30%, respectivamente (Tabla 4.6).

**Tabla 4.6 Aumento de la actividad fosforolítica frente a *ara-U* de las variantes de TtPyNP generadas por ISM.** Incremento de la actividad expresado en porcentaje respecto a la especie silvestre. N/D= no detectado.

Librería	Mejor mutante	Incremento de la actividad
MET62	M62L	10
HIS81	N/D	-
LEU113	N/D	-
HIS115	N/D	-
THR116	N/D	-
TYR164	N/D	-
ASP168	N/D	-
VAL173	N/D	-
GLU174	N/D	-
ILE179	N/D	-
PHE206	N/D	-
LYS360	K360T	36
	K360I	34
	K360D	30

<i>Thermus thermophilus</i> HB27	1	NDPVVFIREKKGQGGGREDLEAFLLGVIRDEVFDYQVAALMAAFIRGLDAEETLULTETARSQKVLDSG-LPHVD	79
<i>Thermotoga petrophila</i>	1	NDPVDFVIRKNGEKLREEIEFVGGVYKGEIPDYQMAAFMAVYFRLDEEETVYFETARSQKVLDSIEIPGKVD	80
<i>Dictyoglomus turgidum</i>	1	NDVIDIINGNGEALSEEKISFVVDGYVKGIPDYQMSALMAVYFGRNIEETITLTDQVAYSGKVLDSISPGKVD	80
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	1	NDVIDLINDGGGGLTKKEIDFIISSTYQYIPDYQMSALMAVYFGRNIEETITLTDQVAYSGKVLDSISPGKVD	80
<i>Blautia hansenii</i>	1	NDVIDLINDGGGGLTKKEIDFIISSTYQYIPDYQMSALMAVYFGRNIEETITLTDQVAYSGKVLDSISPGKVD	80
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	1	NDVIDLIAGGGGGLTKKEIDFIISSTYQYIPDYQMSALMAVYFGRNIEETITLTDQVAYSGKVLDSISPGKVD	80
<i>Clostridium thermocellum</i>	1	NDVIDLIAGGGGGLTKKEIDFIISSTYQYIPDYQMSALMAVYFGRNIEETITLTDQVAYSGKVLDSISPGKVD	80
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	1	NDVIDLIAGGGGGLTKKEIDFIISSTYQYIPDYQMSALMAVYFGRNIEETITLTDQVAYSGKVLDSISPGKVD	80
<i>Clostridiales</i> sp. SSC/2	1	NDVIDLIAGGGGGLTKKEIDFIISSTYQYIPDYQMSALMAVYFGRNIEETITLTDQVAYSGKVLDSISPGKVD	80
<i>Atopobium rimae</i>	1	NDVIDLIAGGGGGLTKKEIDFIISSTYQYIPDYQMSALMAVYFGRNIEETITLTDQVAYSGKVLDSISPGKVD	80
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	80	KISTGGVGDKYSIVVGPILAASGCTFAMKISGRGLGTTGOTIDKLESVFGHRCENTAEFLERARKVGLVIAAQSFDAFLZ	159
<i>Thermotoga petrophila</i>	81	KISTGGVGDKYSIVVGPILAASGCTFAMKISGRGLGTTGOTIDKLESVFGHRCENTAEFLERARKVGLVIAAQSFDAFLZ	160
<i>Dictyoglomus turgidum</i>	81	KISTGGVGDKYSIVVGPILAASGCTFAMKISGRGLGTTGOTIDKLESVFGHRCENTAEFLERARKVGLVIAAQSFDAFLZ	160
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	81	KISTGGVGDKYSIVVGPILAASGCTFAMKISGRGLGTTGOTIDKLESVFGHRCENTAEFLERARKVGLVIAAQSFDAFLZ	160
<i>Blautia hansenii</i>	81	KISTGGVGDKYSIVVGPILAASGCTFAMKISGRGLGTTGOTIDKLESVFGHRCENTAEFLERARKVGLVIAAQSFDAFLZ	160
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	81	KISTGGVGDKYSIVVGPILAASGCTFAMKISGRGLGTTGOTIDKLESVFGHRCENTAEFLERARKVGLVIAAQSFDAFLZ	160
<i>Clostridium thermocellum</i>	81	KISTGGVGDKYSIVVGPILAASGCTFAMKISGRGLGTTGOTIDKLESVFGHRCENTAEFLERARKVGLVIAAQSFDAFLZ	160
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	81	KISTGGVGDKYSIVVGPILAASGCTFAMKISGRGLGTTGOTIDKLESVFGHRCENTAEFLERARKVGLVIAAQSFDAFLZ	160
<i>Clostridiales</i> sp. SSC/2	81	KISTGGVGDKYSIVVGPILAASGCTFAMKISGRGLGTTGOTIDKLESVFGHRCENTAEFLERARKVGLVIAAQSFDAFLZ	160
<i>Atopobium rimae</i>	81	KISTGGVGDKYSIVVGPILAASGCTFAMKISGRGLGTTGOTIDKLESVFGHRCENTAEFLERARKVGLVIAAQSFDAFLZ	160
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	160	DGKIALPVTATVTSIPLASSINSHKLAAGADIVLVKTCGAGTDEKLEEARLAKTHVAIQGAGRPVALITNE	239
<i>Thermotoga petrophila</i>	161	DGKIALPVTATVTSIPLASSINSHKLAAGADIVLVKTCGAGTDEKLEEARLAKTHVAIQGAGRPVALITNE	240
<i>Dictyoglomus turgidum</i>	161	DGKIALPVTATVTSIPLASSINSHKLAAGADIVLVKTCGAGTDEKLEEARLAKTHVAIQGAGRPVALITNE	240
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	161	DGKIALPVTATVTSIPLASSINSHKLAAGADIVLVKTCGAGTDEKLEEARLAKTHVAIQGAGRPVALITNE	240
<i>Blautia hansenii</i>	161	DGKIALPVTATVTSIPLASSINSHKLAAGADIVLVKTCGAGTDEKLEEARLAKTHVAIQGAGRPVALITNE	240
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	161	DGKIALPVTATVTSIPLASSINSHKLAAGADIVLVKTCGAGTDEKLEEARLAKTHVAIQGAGRPVALITNE	240
<i>Clostridium thermocellum</i>	161	DGKIALPVTATVTSIPLASSINSHKLAAGADIVLVKTCGAGTDEKLEEARLAKTHVAIQGAGRPVALITNE	240
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	161	DGKIALPVTATVTSIPLASSINSHKLAAGADIVLVKTCGAGTDEKLEEARLAKTHVAIQGAGRPVALITNE	240
<i>Clostridiales</i> sp. SSC/2	161	DGKIALPVTATVTSIPLASSINSHKLAAGADIVLVKTCGAGTDEKLEEARLAKTHVAIQGAGRPVALITNE	240
<i>Atopobium rimae</i>	161	DGKIALPVTATVTSIPLASSINSHKLAAGADIVLVKTCGAGTDEKLEEARLAKTHVAIQGAGRPVALITNE	240
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	240	APLGRAVNAIEVPAEALNGEGPE---DLIEVALAAEALKLEGIDPALA-----PAAEGGAALKYPAFLAAG	310
<i>Thermotoga petrophila</i>	241	QPLGAVNGHLEVEIAETLNGEGPE---DLNDLSITLGAHLLEAGVA-DYDGGKILQTKLETGAELEKPILYAAG	316
<i>Dictyoglomus turgidum</i>	241	QPLGAVNGHLEVEIAETLNGEGPE---DLNDLSITLGAHLLEAGVA-DYDGGKILQTKLETGAELEKPILYAAG	317
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	241	YPLGAVNGHLEVEIAETLNGEGPE---DLNDLSITLGAHLLEAGVA-DYDGGKILQTKLETGAELEKPILYAAG	317
<i>Blautia hansenii</i>	241	YPLGAVNGHLEVEIAETLNGEGPE---DLNDLSITLGAHLLEAGVA-DYDGGKILQTKLETGAELEKPILYAAG	316
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	241	YPLGAVNGHLEVEIAETLNGEGPE---DLNDLSITLGAHLLEAGVA-DYDGGKILQTKLETGAELEKPILYAAG	317
<i>Clostridium thermocellum</i>	241	YPLGAVNGHLEVEIAETLNGEGPE---DLNDLSITLGAHLLEAGVA-DYDGGKILQTKLETGAELEKPILYAAG	317
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	241	YPLGAVNGHLEVEIAETLNGEGPE---DLNDLSITLGAHLLEAGVA-DYDGGKILQTKLETGAELEKPILYAAG	317
<i>Clostridiales</i> sp. SSC/2	241	YPLGAVNGHLEVEIAETLNGEGPE---DLNDLSITLGAHLLEAGVA-DYDGGKILQTKLETGAELEKPILYAAG	317
<i>Atopobium rimae</i>	241	YPLGAVNGHLEVEIAETLNGEGPE---DLNDLSITLGAHLLEAGVA-DYDGGKILQTKLETGAELEKPILYAAG	316
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	311	GDPRVED-FSLLPLAE-ENPLAEREGVVEVDAYKVLAVLALGGGNGGEGFIDNGGVYLVKPGDVERGEALAL	388
<i>Thermotoga petrophila</i>	317	GDPRVED-FSLLPLAE-ENPLAEREGVVEVDAYKVLAVLALGGGNGGEGFIDNGGVYLVKPGDVERGEALAL	396
<i>Dictyoglomus turgidum</i>	318	GDPRVED-FSLLPLAE-ENPLAEREGVVEVDAYKVLAVLALGGGNGGEGFIDNGGVYLVKPGDVERGEALAL	396
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	318	GDPRVED-FSLLPLAE-ENPLAEREGVVEVDAYKVLAVLALGGGNGGEGFIDNGGVYLVKPGDVERGEALAL	396
<i>Blautia hansenii</i>	317	GDPRVED-FSLLPLAE-ENPLAEREGVVEVDAYKVLAVLALGGGNGGEGFIDNGGVYLVKPGDVERGEALAL	395
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	318	GDPRVED-FSLLPLAE-ENPLAEREGVVEVDAYKVLAVLALGGGNGGEGFIDNGGVYLVKPGDVERGEALAL	396
<i>Clostridium thermocellum</i>	318	GDPRVED-FSLLPLAE-ENPLAEREGVVEVDAYKVLAVLALGGGNGGEGFIDNGGVYLVKPGDVERGEALAL	396
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	318	GDPRVED-FSLLPLAE-ENPLAEREGVVEVDAYKVLAVLALGGGNGGEGFIDNGGVYLVKPGDVERGEALAL	396
<i>Clostridiales</i> sp. SSC/2	318	GDPRVED-FSLLPLAE-ENPLAEREGVVEVDAYKVLAVLALGGGNGGEGFIDNGGVYLVKPGDVERGEALAL	396
<i>Atopobium rimae</i>	317	GDPRVED-FSLLPLAE-ENPLAEREGVVEVDAYKVLAVLALGGGNGGEGFIDNGGVYLVKPGDVERGEALAL	395
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	389	VYHRRG-LEALGHLREAYALGEEA-HRAPIVLEAI-----	423
<i>Thermotoga petrophila</i>	397	LYVSRSDVENALKLLEAVVISDSFSPKPFKPVVEVVK-----	434
<i>Dictyoglomus turgidum</i>	397	LYVSRSDVENALKLLEAVVISDSFSPKPFKPVVEVVK-----	434
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	397	LYVSRSDVENALKLLEAVVISDSFSPKPFKPVVEVVK-----	431
<i>Blautia hansenii</i>	396	LYVSRSDVENALKLLEAVVISDSFSPKPFKPVVEVVK-----	440
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	397	LYVSRSDVENALKLLEAVVISDSFSPKPFKPVVEVVK-----	433
<i>Clostridium thermocellum</i>	397	LYVSRSDVENALKLLEAVVISDSFSPKPFKPVVEVVK-----	433
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	397	LYVSRSDVENALKLLEAVVISDSFSPKPFKPVVEVVK-----	433
<i>Clostridiales</i> sp. SSC/2	397	LYVSRSDVENALKLLEAVVISDSFSPKPFKPVVEVVK-----	434
<i>Atopobium rimae</i>	396	LYVSRSDVENALKLLEAVVISDSFSPKPFKPVVEVVK-----	441

Figura 4.25 Alineamiento múltiple de secuencia de TtPyNP y sus homólogos en diferentes géneros bacterianos. Incluidos en un recuadro rojo se indican los residuos mutados por ISM y sus correspondencias en el resto de secuencias.

## CAPÍTULO 4. INMOVILIZACIÓN DE LAS ENZIMAS EN SOPORTE SÓLIDO

Un aspecto clave en la aplicación de enzimas a un proceso industrial es su eficiencia global, de modo que se minimicen los costes asociados al empleo de material biológico. A este respecto, la inmovilización de enzimas sobre soportes sólidos es fundamental debido a la recuperación del biocatalizador que permite su uso en subsiguientes ciclos de reacción, ya que de lo contrario la enzima debería ser purificada a partir de un nuevo cultivo celular. Sin embargo, no todos los soportes son adecuados para una enzima concreta, por lo que hay que tener en cuenta las características químicas y estructurales de ambos.

Este último capítulo aborda la evaluación de diferentes soportes para la inmovilización de las NPs de *T. thermophilus* HB27, así como el impacto sobre su actividad y estabilidad.

### 4.4.1 Actividad retenida

TtPNPI, TtPNPII y TtPyNP se inmovilizaron utilizando los soportes y métodos descritos en el apartado 3.8. El porcentaje de proteína inmovilizada que se observó fue superior al 90% en todos los casos. Los derivados inmovilizados se emplearon en los ensayos de actividad fosforolítica según el método descrito en el apartado 3.5.5.2 y usando como control la enzima soluble con el fin de determinar el porcentaje de actividad retenida tras la inmovilización.

Los datos de actividad retenida fueron en todos los casos, tal y como cabía esperar, menores que los de las enzimas solubles (Tabla 4.7). En la actividad retenida por TtPNPI no se observaron grandes variaciones entre los diferentes soportes empleados. La inmovilización en el soporte Q condujo a peores resultados (62% de actividad retenida), mientras que la inmovilización en DEAE fue la más interesante (76% de actividad retenida). En general, no se observó relación entre el efecto sobre la actividad y la naturaleza del soporte; además, se mostraron niveles similares con soportes de unión iónica (DEAE, Q, MANAE, PEI) y covalente (EC-EP, EC-HFA).

TtPNPII mostró una mayor sensibilidad a la inmovilización que sugería una dependencia del grado de libertad que cada soporte permitía a la proteína para el correcto desempeño de la actividad enzimática. Así, soportes como PEI, que forma redes tridimensionales, o EC-HFA, que posee brazos espaciadores largos, permitieron una mayor conservación de la actividad, del 67% y 56%, respectivamente (Tabla 4.7). En cambio, los soportes menos flexibles resultaron contraproducentes para la actividad fosforolítica, y se

observaron valores de conversión inferiores en el caso de MANAE y EC-EP (0,31 y 0,22%, respectivamente) y una pérdida total de la actividad con DEAE y Q (Tabla 4.7).

En último lugar, la inmovilización de TtPyNP sobre soportes iónicos se tradujo en un fuerte descenso del nivel de actividad, como en el caso de DEAE, Q y MANAE, mientras que en el caso de PEI la pérdida de actividad fue moderada, manteniéndose en un 40% (Tabla 4.7). Por otro lado, la inmovilización covalente sobre el derivado epóxido EC-EP se asoció a una pérdida total de actividad, pero cuando se empleó el derivado aminoepóxido (EC-HFA), se mantuvo el 97% de actividad de la proteína (Tabla 4.7).

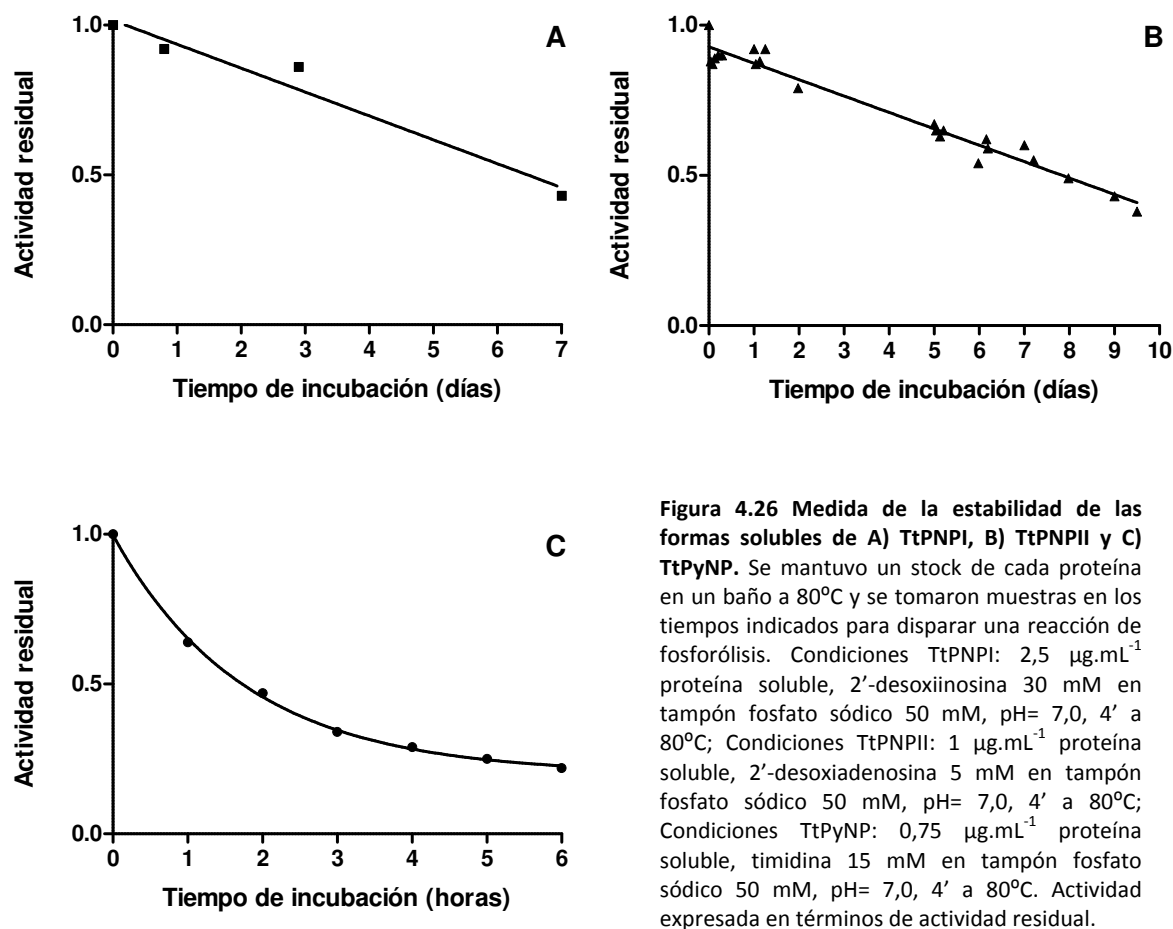
**Tabla 4.7 Actividad retenida por NPs de *T. thermophilus* HB27 tras la inmovilización en soporte sólido.** Condiciones TtPNPI: 2,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  proteína soluble o inmovilizada, 2'-desoxiinosina 30 mM en tampón fosfato sódico 50 mM, pH= 7,0, 4' a 80°C; Condiciones TtPNPII: 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  proteína soluble o inmovilizada, 2'-desoxiadenosina 5 mM en tampón fosfato sódico 50 mM, pH= 7,0, 4' a 80°C; Condiciones TtPyNP: 0,75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  proteína soluble o inmovilizada, timidina 15 mM en tampón fosfato sódico 50 mM, pH= 7,0, 4' a 80°C. Actividad expresada en términos de actividad residual. N/D: no detectado. Funcionalización de los soportes: DEAE: dietil-aminoetilo; Q: amina cuaternaria; MANAE: monoamino-N-aminoetilo; PEI: polietilenimina; EC-EP: epóxido; EC-HFA: aminoepóxido.

	Enzima soluble	DEAE	Q	MANAE	PEI	EC-EP	EC-HFA
TtPNPI	1,00	0,76	0,62	0,66	0,63	0,72	0,67
TtPNPII	1,00	N/D	N/D	0,31	0,67	0,22	0,56
TtPyNP	1,00	0,15	0,17	0,05	0,41	N/D	0,97

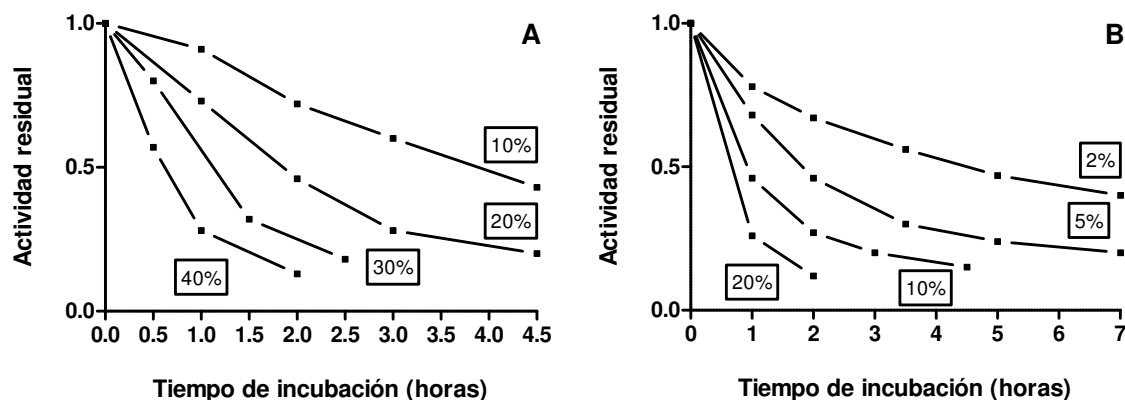
#### 4.4.2 Termoestabilización por inmovilización

Una de las ventajas asociadas a la inmovilización en soporte sólido es su contribución a la estabilización de la proteína. A fin de determinar estos efectos sobre las NPs de *T. thermophilus* HB27, previamente se llevaron a cabo experimentos de termoestabilidad sobre las proteínas en su forma soluble.

TtPNPI y TtPNPII exhibieron en su forma soluble una elevada estabilidad a 80°C, con una vida media de 6,3 y 9,2 días, respectivamente (Figura 4.26A y B), en concordancia con los datos de actividad obtenidos anteriormente (Figuras 4.11C y 4.16A). En contraste, TtPyNP mostró mayor sensibilidad a las altas temperaturas, con una vida media de 1,8 horas (Figura 4.26C).



Debido al elevado tiempo necesario para observar el decaimiento del 50% de actividad de TtPNPI y TtPNP II, se consideró necesario simplificar las subsiguientes medidas de estabilidad de los derivados inmovilizados, de modo que se llevaron a cabo nuevos estudios de estabilidad a 80°C en presencia de concentraciones crecientes de un agente desestabilizante, a fin de establecer condiciones que permitieran observar la vida media a tiempos cortos (1-2 horas). El desestabilizante elegido para ello fue el 1,4-dioxano, al ser un compuesto orgánico miscible en agua totalmente apolar, lo que le confiere un carácter de disolvente agresivo frente a las enzimas. A medida que se aumentó el porcentaje de 1,4-dioxano en el medio, aumentó la velocidad de desactivación, sobre todo de TtPNP II, que fue la más sensible a la presencia de este disolvente (Figura 4.27)



A la luz de estos resultados, se eligieron 20% y 10% de 1,4-dioxano como aditivos desestabilizantes en el estudio de la desactivación de los derivados inmovilizados de TtPNPI y TtPNPII, respectivamente. Los datos de estabilidad térmica de los derivados inmovilizados en los diferentes soportes se muestran en la Tabla 4.8.

La vida media de TtPNPI aumentó con su inmovilización sobre todos los soportes, si bien el incremento fue moderado, observándose los mejores resultados en el derivado de aminoepóxido EC-HFA, cuya vida media se multiplicó en un factor de 3,64. En el caso de TtPNPII, los soportes iónicos MANAE y PEI, y el derivado de epóxido EC-EP no alteraron la vida media; se observaron valores muy similares a los obtenidos con la enzima soluble, y sólo el derivado de EC-HFA consiguió duplicar este valor. Finalmente, la inmovilización de TtPyNP tuvo efectos positivos claros sobre la vida media, presumiblemente a causa de una estabilización de la enzima por el soporte. La estabilidad del derivado inmovilizado en MANAE sufrió una pérdida acusada de estabilidad y se perdió la totalidad de la actividad en menos de una hora. El derivado aminoepóxido tuvo un efecto moderado sobre la vida media y un aumento en un factor de 1,55x, mientras que en el caso de los soportes iónicos Q, DEAE y PEI, estos valores aumentaron dramáticamente, ya que se multiplicaron por factores de 13, 16 y 24x, respectivamente.



**Tabla 4.8 Vida media, expresada en relación a la observada para la especie soluble, de las NPs de *T. thermophilus* HB27.** Se mantuvo un stock de cada proteína en un baño a 80°C y se tomaron muestras en los tiempos indicados para disparar una reacción de fosforólisis. Condiciones TtPNPI: 2,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  derivado inmovilizado, 2'-desoxiinosina 30 mM en tampón fosfato sódico 50 mM, pH= 7,0 y 1,4-dioxano 20%, 4' a 80°C; Condiciones TtPNPII: 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  derivado inmovilizado, 2'-desoxiadenosina 5 mM en tampón fosfato sódico 50 mM, pH= 7,0 y 1,4-dioxano 10%, 4' a 80°C; Condiciones TtPyNP: 0,75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  derivado inmovilizado, timidina 15 mM en tampón fosfato sódico 50 mM, pH= 7,0, 4' a 80°C. Funcionalización de los soportes: DEAE: dietil-aminoetilo; Q: amina cuaternaria; MANAE: monoamino-N-aminoetilo; PEI: polietilenimina; EC-EP: epóxido; EC-HFA: aminoepóxido.

	Enzima soluble	DEAE	Q	MANAE	PEI	EC-EP	EC-HFA
TtPNPI	1,00	2,95	1,16	2,16	3,60	1,22	3,64
TtPNPII	1,00	-	-	0,91	0,98	0,95	2,08
TtPyNP	1,00	16,07	12,83	N/D	24,12	-	1,55







## 5 DISCUSIÓN

El objetivo fundamental del presente trabajo ha sido la obtención de nuevos biocatalizadores de origen termófilo que introdujeran una novedad o una ventaja sobre los actualmente disponibles para la síntesis de compuestos de alto valor añadido. Por sus características, previamente analizadas en la introducción, las termozimas suponen una alternativa interesante a la biocatálisis mediada por enzimas de origen mesófilo. Por este motivo, se decidió indagar en la capacidad de once cepas distintas de *T. thermophilus* para llevar a cabo diferentes reacciones de prueba a fin de identificar actividades enzimáticas destacables que pudieran escalarse posteriormente a un biorreactor. Tras la elaboración de estos estudios preliminares, se decidió que la actividad más interesante de todas las observadas era la síntesis de nucleósidos por transglicosilación.

### ***Thermus thermophilus* HB27 ES ACTIVA EN LA SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS POR TRANSGLICOSILACIÓN MEDIADA POR TRES NUCLEÓSIDO FOSFORILASAS**

Las once cepas ensayadas mostraron capacidad de sintetizar nucleósidos por transglicosilación entre un nucleósido de pirimidina donador y una base purínica aceptora, exhibiendo valores de productividad equivalentes entre ellas. No obstante, teniendo en cuenta que las productividades se relativizaron en términos de conversión de sustrato por número de células, y debido a que las diferentes cepas podían presentar diferentes estados de crecimiento, no se tuvieron en cuenta los valores absolutos para establecer una comparativa entre ellas y sólo se compararon las variaciones internas de productividad empleando diferentes sustratos. Las cepas no mostraron especificidades de sustrato estrictas, pero se observaron ciertas selectividades en cuanto a la base nitrogenada y al residuo glicosídico transferido. En lo referente a la base, todas las cepas fueron capaces de utilizar como donadores de azúcar tanto nucleósidos de uracilo como de timina, aunque fue con el primero con el que consiguió mejores productividades. En cualquier caso, la transferencia fue efectiva a purinas sustituidas tanto 6-oxo (hipoxantina) como 6-amino (adenina). En cuanto a la selectividad mostrada hacia la pentosa, todas las cepas obtuvieron mayores rendimientos con los derivados de 2'-desoxirribosa que con los de ribosa.

La productividad fue proporcional a la relación molar de los sustratos empleados (nucleósido donador/base aceptora), lo que indicaría que el paso limitante de la reacción global se encuentra en la hidrólisis del enlace N-glicosídico del nucleósido que libera la pentosa,

o bien que existen diferencias en el transporte de los nucleósidos donadores y las bases nitrogenadas aceptoras a través de la membrana bacteriana. En *E. coli* se han descritos dos transportadores codificados por los genes *nupC* y *nupG* que introducen nucleósidos en el citoplasma mediante transporte acoplado con  $H^+$  (Patching y cols., 2005), mientras que las bases nitrogenadas se introducen mediante transportadores pertenecientes a las familias NAT y PRT (de Koning y Diallinas, 2000). Debido a que el transporte de los nucleósidos está acoplado a la disipación del gradiente de  $H^+$  y que las células empleadas para la transformación se encuentran en estado de reposo, es probable que o bien en el momento de la reacción este gradiente esté cercano a la disipación, dificultando el transporte eficiente al citoplasma, o bien que parte de los nucleósidos se deriven para la obtención de carbono y energía para la formación de dicho gradiente. Como consecuencia del transporte asimétrico de bases nitrogenadas y nucleósidos, y debido a la estequiometría 1:1 de la reacción, la concentración externa del sustrato de transporte más lento tendría un impacto mayor en la productividad de la reacción. En cualquier caso, en la bibliografía dedicada al respecto se describe la necesidad de un exceso de nucleósido donador para reacciones catalizadas por NPs (Trelles y cols., 2004; Lewkowicz y Iribarren, 2006).

Las actividades adenosín-deaminasa (ADA; EC 3.5.4.4) y adenasa (EC 3.5.4.2) catalizan la desaminación específica del grupo amino en la posición 6 de la adenina y liberan hipoxantina como producto. Estas actividades secundarias, observadas en microorganismos mesófilos como en *E. coli*, tienen un impacto negativo sobre la productividad en la síntesis de nucleósidos de 6-aminopurina. Para solventar este problema se recurre al incremento de la temperatura de reacción hasta los 60°C (Trelles y cols., 2004; Trelles y cols., 2005) si bien esto repercute en la viabilidad celular, lo que en última instancia se traduce en una reducción de la vida útil del biocatalizador. Estas actividades secundarias se encontraron ausentes en las once cepas de *T. thermophilus*, en la que la transglicosilación de adenina transcurrió sin observarse productos de degradación. La búsqueda de homólogos de ADA y adenasa en el genoma de HB8, HB27 y PRQ25 (únicos genomas secuenciados de las once cepas) no proporcionó resultados significativos. Si estos microorganismos carecen de dichas actividades enzimáticas, o si por el contrario son catalizadas por enzimas análogas que no se expresan en las condiciones de ensayo no puede ser aseverado, por lo que podría constituir la base de futuros estudios, ya que, aunque, en este caso concreto se trata de actividades indeseables, pueden resultar interesantes aplicadas a la modificación enzimática de nucleósidos (ver apartado 1.5.1).

A pesar del interés de la transglicosilación observada en células enteras de *T. thermophilus*, de su promiscuidad y de la limpieza de la reacción, el empleo de células enteras

en procesos biocatalíticos no está exenta de algunos inconvenientes, como es la necesidad de mantener unas condiciones estrictas del fermentador para prevenir la lisis celular o la desregulación metabólica, o las estrictas condiciones restrictivas de supervisión que impone la normativa sobre el empleo de células en la síntesis de fármacos, especialmente para aquellos que se administran por vía parenteral. Por ello, se decidió llevar a cabo la búsqueda de las enzimas responsables de la actividad observada para su expresión y purificación, y a tal efecto se eligió la cepa HB27 para el cribado virtual de su genoma. Esta cepa mostró buenos rendimientos en las reacciones de transglicosilación y se trata de una cepa genéticamente manipulable cuyo genoma ha sido secuenciado y anotado en las bases de datos (Henne y cols., 2004). La versatilidad exhibida en el reconocimiento de la base nitrogenada, la preferencia por 2'-desoxinucleósidos y el carácter acidófilo de la reacción, que transcurrió mejor a valores de pH ácidos, suponían indicios de que tras las reacciones de transglicosilación observadas en las células enteras podría encontrarse una NdRT, cuyos óptimos de pH se han descrito en rangos ácidos (Fernandez-Lucas y cols., 2010; Fernandez-Lucas y cols., 2011). Sin embargo, la búsqueda en las bases de datos no devolvió ninguna entrada anotada como tal, y en cambio sí se recogieron tres ORFs cuyos productos teóricos estaban anotados como NPs (Locus ID TTC0194, TTC1070 y TTC1412), así como tres secuencias adicionales que presentaban posibles dominios de unión a nucleósido y transglicosilasa (Locus ID TTC0188, TTC1185 y TTC1491).

De los seis clones de expresión en *E. coli*, cinco dieron lugar a una proteína del tamaño esperado, mientras que en el caso de TTC1185 no se observó expresión alguna. Aunque no se puede aseverar la causa de esta ausencia de expresión, el hecho experimental es que entre el 20 y el 40% de las secuencias de termófilos no se pueden expresar en *E. coli* debido a fenómenos de toxicidad o a interferencias en el plegamiento derivadas de la diferencia entre las temperaturas óptimas del microorganismo de origen y el hospedador (Jenney y Adams, 2008). El análisis de la secuencia de TTC1185 empleando diferentes algoritmos como TMpred o DAS revelaron una región entre los residuos 36 y 57 con alta probabilidad de pertenecer a un dominio transmembrana, que podrían explicar un efecto tóxico del producto de expresión durante su plegamiento en el citoplasma de *E. coli*. No obstante, la predicción no pudo acompañarse de una observación experimental, por lo que esta hipótesis posee un carácter meramente especulativo.

Los productos de expresión se purificaron mediante desnaturalización diferencial por tratamiento térmico a 80°C. Este método permitió separar por centrifugación los agregados correspondientes a las proteínas de *E. coli* que se habían desnaturalizado y obtener una pureza

media del 40%. El rendimiento global de la expresión y purificación osciló entre los 4 y los 8 mg de proteína recombinante por gramo de masa celular de *E. coli* (peso húmedo).

Las reacciones de prueba para detectar actividad NPasa en los productos de expresión purificados consistieron en el seguimiento de la fosforólisis de una batería de nucleósidos que cubrían todas las purinas y pirimidinas naturales conjugadas tanto con ribosa como con 2'-desoxirribosa. De las cinco proteínas ensayadas, solo las tres que estaban anotadas en la base de datos como NPs dieron resultados positivos y mostraron especificidades claras y no solapantes: TTC0194 mostró especificidad hacia nucleósidos de adenina (6-aminopurina), TTC1070 hacia nucleósidos de guanina e hipoxantina (6-oxopurinas) y TTC1412 hacia nucleósidos de timina y uracilo; en cambio, no se detectó actividad frente a nucleósidos de citosina por parte de ninguna de ellas. Las tres enzimas reconocieron conjugados de ribosa y 2'-desoxirribosa, si bien los rendimientos observados con estos últimos fueron mayores. Estas actividades estarían de acuerdo con lo observado en los ensayos de transglicosilación empleando células enteras, ya que una combinación de las tres enzimas podría llevar a cabo la transferencia de pentosas, preferentemente 2'-desoxirribosa, entre todos los nucleósidos naturales posibles, a excepción de la citosina, que no es un sustrato para ningún miembro descrito de la familia de las NPs. La confirmación de que la liberación de la base mediada por estas enzimas se correspondía con una actividad NPasa (fosforolítica y reversible) y no con una nucleosidasa (hidrolítica e irreversible) se confirmó por la ausencia de actividad cuando la reacción no transcurrió en tampón fosfato sódico (el fosfato actúa como sustrato de la vía fosforolítica de las NPs), y se vio reforzada por la observación de actividad sintética en presencia de una base libre y una pentosa-1P, en la que las enzimas exhibieron la misma especificidad de sustrato que en la fosforólisis. Además, no se observó actividad en los controles, constituidos por extractos celulares de clones que portaban el vector de expresión vacío, y que habían sido sometidos al mismo tratamiento de calor, lo que puso de manifiesto la eficiencia del método de purificación, ya que permite expresar la enzima sin necesidad de añadir extensiones de polihistidina o dominios de unión a biotina o maltosa, y recupera una cantidad notable de la misma sin comprometer la actividad enzimática por aparición de reacciones secundarias mediadas por proteínas del hospedador.

Los productos de expresión de TTC0188 y TTC1491 no se mostraron activos en la fosforólisis de nucleósidos y, por lo tanto, fueron descartados en futuros experimentos. Estas proteínas se habían incluido inicialmente para su clonación debido a que exhibían secuencias y dominios similares a NPs. Sin embargo, análisis *in silico* revelaron que TTC0188 posee similitud de secuencia con la enzima futalosina sintasa de microorganismos pertenecientes a los



géneros *Thermus* y *Meiothermus*. Esta actividad, que forma parte de una ruta alternativa de síntesis de menaquinona recientemente descrita, cataliza la fosforólisis reversible de fualosina (Hiratsuka y cols., 2008) y este compuesto consta de una inosina conjugada a una molécula de corismato, lo que explicaría la existencia de un dominio de unión de purinas similar al de una PNP. Por otro lado, TTC1491 se encontraba anotada en la base de datos como una posible antranilato-fosforribosiltransferasa. Aunque esta enzima, implicada en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, no cataliza una reacción NPasa, poseen similitudes significativas con las NPs y por lo tanto se ha incluido en la misma familia que éstas (Pugmire y Ealick, 2002). A pesar de que estas dos enzimas, por carecer de actividad NPasa, no fueron objeto de subsiguientes estudios en el presente trabajo, su posible aplicación biosintética deberá ser evaluada en el futuro. Especialmente interesante es la actividad fualosina sintasa predicha para TTC0188 y su implicación en una ruta alternativa de síntesis de menaquinona recientemente descrita para algunas especies bacterianas (Hiratsuka y cols., 2008). Las enzimas de esta ruta, presentes en microorganismos patógenos como *Helicobacter pylori*, son una diana para el desarrollo de inhibidores específicos (Tanaka y cols., 2011), y la disponibilidad de una enzima homóloga en un microorganismo termófilo abriría la posibilidad de desarrollar compuestos análogos a los intermediarios de la ruta en patógenos con aplicación en el tratamiento de sus patologías asociadas. Otra propiedad descrita para los análogos de fualosina ha sido la capacidad de inhibir el crecimiento de líneas tumorales como HeLa-S3 (Hosokawa y cols., 1999), por lo que enzimas como TTC0188 podrían servir en un futuro como herramientas para la biosíntesis de una nueva familia de compuestos con propiedades antitumorales.

El hecho de que las NPs de *T. thermophilus* HB27 muestren selectividad hacia 2'-desoxirribosa resultó sorprendente, ya que contradice lo observado en las NPs de microorganismos mesófilos, donde se observa selectividad hacia ribosa (Pugmire y Ealick, 2002), lo que podría obedecer a las necesidades energéticas derivadas del entorno extremo que habita este microorganismo. *T. thermophilus* HB27 presenta una extraordinariamente eficiente maquinaria de competencia natural que le permite incorporar ADN exógeno a una tasa de hasta  $40 \text{ kB.s}^{-1}$ , por lo que se ha sugerido que ésta podría ser responsable de la adaptación a ambientes termófilos mediada por transferencia horizontal de genes (Averhoff y Muller, 2010). Una vez incorporado el ADN, éste es descompuesto en 2'-desoxinucleósidos y éstos, a su vez, son fosforolizados por NPs, lo que genera una base libre que es reutilizada por la bacteria, así como una 2'-desoxirribosa-1P que entra en el ciclo de las pentosas-fosfato para generar gliceraldehído-3P lo que permite, a su vez, la obtención de ATP a través de la vía

glicolítica. Por lo tanto, una selectividad de las NPs hacia 2'-desoxinucleósidos le proporcionaría a *T. thermophilus* una ventaja adaptativa en un entorno en el que el ADN se emplea eficazmente como nutriente.

Las proteínas TTC0194, TTC1070 y TTC1412, confirmadas como NPs genuinas, se renombraron atendiendo a sus especificidades de sustrato como TtPNPII, TtPNPI y TtPyNP, respectivamente. A partir de los datos obtenidos en los experimentos de ultracentrifugación analítica se dedujo que TtPNPI era un homohexámero, TtPNPII un monómero y TtPyNP un homodímero. Siguiendo la clasificación propuesta por Pugmire y Ealick (Pugmire y Ealick, 2002), TtPNPI sería una PNP incluida en el tipo-I, y su estructura cuaternaria estaría de acuerdo con la de su homólogo en *T. thermophilus* HB8 (Tahirov y cols., 2004), mientras que TtPNPII sería una excepción a esta clasificación al ser específica de 6-aminopurinas, a diferencia de otras PNPs tipo-I que reconocen 6-oxo y 6-aminopurinas indistintamente (Bzowska y cols., 2000; Pugmire y Ealick, 2002). Además, resulta sorprendente la configuración monomérica que exhibe esta proteína, ya que no se corresponde con la estructura tridimensional de ninguna NP resuelta hasta la fecha. De hecho, las NPs con mayor similitud a TtPNPII, como la PNP humana, con la que comparte un 46% de identidad de secuencia (Afshar y cols., 2009), exhiben configuraciones homotriméricas. Si TtPNPII posee una configuración monomérica en el citoplasma de *T. thermophilus* HB27 o si se debe a un estado artefactual, resultado de su expresión en un microorganismo heterólogo o del tratamiento térmico durante su purificación, deberá ser objeto de futuros estudios. No obstante, esta enzima presenta actividad en su forma monomérica, por lo que una posible forma oligomérica no obedecería a una funcionalidad estructural y debería cumplir otro papel, presumiblemente regulatorio. Por otro lado, debido a la especificidad mostrada por TtPyNP hacia timina y uracilo, esta enzima quedaría incluida en el tipo-II de las NPs. En organismos superiores y en parte de las especies del dominio Bacteria se produce una diferenciación en la especificidad hacia estas dos pirimidinas, y las actividades UP y TP las catalizan dos enzimas diferentes. Sin embargo, existe una forma de NP que reconoce ambas pirimidinas denominada genéricamente PyNP, y que hasta este momento solo había sido descrita en *H. influenzae* (Scocca, 1971) y *G. stearothermophilus* (Okuyama y cols., 1996). Nuestros datos experimentales confirman que en *T. thermophilus* estas dos actividades también están catalizadas por una misma enzima. Tal y como se ha descrito hasta la fecha para todas las PyNPs, TtPyNP no reconoce nucleósidos de citosina, cuya diferencia estructural con el uracilo reside en la presencia de un grupo amino en sustitución de un carbonilo en la posición 4 del anillo de pirimidina.

Los parámetros cinéticos determinados para fosforólisis de los sustratos naturales de estas enzimas revelaron que, a pesar del mayor rendimiento observado con 2'-desoxinucleósidos, éstas enzimas tienen mayor afinidad hacia nucleósidos de ribosa, tal y como se puede deducir de los valores de  $K_m$  más bajos observados para éstos últimos. No obstante, la eficiencia catalítica, expresada como la razón  $k_{cat}/K_m$ , sí fue mayor con 2'-desoxinucleósidos, excepto para el par uridina/2'-desoxiuridina, que presentaron eficiencias equivalentes. Comparando estos valores con los de PNPs mesófilas como las de *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Homo sapiens* o *E. coli* (Chaudhary y cols., 2006), se observa que a 80°C las enzimas termófilas poseen afinidades ( $1/K_m$ ) inferiores en dos órdenes de magnitud con respecto a sus contrapartes mesófilas a 37°C, mientras que su  $k_{cat}$  experimenta un incremento en la misma magnitud. Esta diferencia en las propiedades cinéticas de las NPs de *T. thermophilus* HB27 se podría explicar por las temperaturas a las que transcurren las diferentes reacciones, ya que a 80°C la estructura de la proteína es más flexible, por lo que el sustrato es reconocido con mayor dificultad como consecuencia del aumento de energía cinética del sistema, pero una vez se ha unido, la reacción se ve favorecida por la temperatura, lo que se traduce en un aumento de la  $k_{cat}$ . Esta hipótesis sería consistente con la similitud observada entre los valores de  $K_m$  de las NPs de *T. thermophilus* HB27 y las del termófilo *G. stearothermophilus*, obtenidos ambos a 50°C (Hamamoto y cols., 1996), así como los obtenidos a 37°C para la PNP del microorganismo psicrófilo *Pseudoalteromonas* sp., cuya temperatura óptima de crecimiento se sitúa en los 20°C (Wang y cols., 2010).

Tal y como cabe esperar debido a su origen termófilo, las NPs de *T. thermophilus* HB27 mostraron actividad a altas temperaturas, sin que se haya podido determinar experimentalmente la temperatura máxima, ya que por encima de los 95°C se nos plantearon dificultades técnicas inabordables para llevar a cabo reacciones en medio acuoso. No obstante, resultó llamativa la gran diferencia entre la temperatura máxima de actividad de estas enzimas *in vitro* con respecto a la temperatura máxima de crecimiento de la cepa de procedencia (hasta 82°C), lo cual supone un indicio de que las tres NPs caracterizadas en este trabajo podrían haberse incorporado al genoma de *T. thermophilus* HB27 mediante transferencia horizontal desde bacterias o arqueas hipertermófilas, cuyas temperaturas de crecimiento son cercanas o superiores a los 100°C. La transferencia horizontal de genes, que es especialmente común en cepas del género *Thermus* debido a su competencia natural, se ha postulado que está en la base de la adquisición del carácter termófilo de este género en su divergencia con el género *Deinococcus* a partir de un antecesor mesófilo (Omelchenko y cols., 2005). En cuanto su estabilidad térmica, TtPNPI y TtPNPII mostraron una vida media a 80°C de 6,3 y 9,2 días,

respectivamente, mientras que TtPyNP mostró mayor sensibilidad térmica con una vida media de 1,8 horas. La explicación a esta relativa termolabilidad de TtPyNP podría residir en la funcionalidad del dímero, propuesta por Pugmire y Ealick (Pugmire y Ealick, 2002), en la que parte de los residuos involucrados en la catálisis podría ser aportado por la otra subunidad, por lo que el desensamblaje del dímero a temperaturas muy altas conllevaría a la pérdida de función. Como ventaja asociada a su origen termófilo, las enzimas retuvieron su actividad tras meses almacenados a 4°C y mostraron tolerancia a un amplio margen de valores de pH, exhibiendo un plató óptimo desde 5,0 hasta 7,0, lo que supone una gran ventaja en procesos de biocatálisis en los que la mezcla de reacción sufre cambios en el pH a lo largo del proceso, ya que esta propiedad reduce los costes asociados a la necesidad de regulación de la acidez del reactor. TtPNPI y TtPNPII mostraron también una gran tolerancia a elevadas concentraciones de sal, reteniendo el 100% de actividad a concentraciones de tampón fosfato sódico de 200 mM. TtPyNP mostró mayor sensibilidad a este respecto, ya que perdió el 80% de actividad a dicha concentración, lo que, una vez más, se podría explicar por el desensamblaje del dímero a valores elevados de fuerza iónica.

### **NPs de *T. thermophilus* HB27 EN LA SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS CON PROPIEDADES TERAPÉUTICAS**

Los análogos de nucleósidos empleados en ensayos de fosforólisis y síntesis permitieron caracterizar aquellas posiciones de la molécula que la enzima necesitaba para su reconocimiento respecto a aquellas otras que permitían cierta modificación estructural.

Las tres enzimas mostraron gran sensibilidad a las modificaciones estructurales de la pentosa y ausencia de actividad sobre compuestos que presentaban ciclos abiertos (aciclovir) o sobre nucleótidos (AZT). Cuando el nucleósido estaba formado por arabinosa, un isómero de la 2'-desoxirribosa cuyo grupo hidroxilo en posición 2' presenta configuración  $\alpha$ , TtPNPII y TtPyNP retuvieron un 10% de actividad con respecto al isómero natural. No obstante, esta actividad observada por parte de TtPyNP, si bien limitada, se consideró lo suficientemente interesante como para ser objeto de mejora por técnicas de evolución dirigida (*ver más adelante*). Esto estaba motivado por el hecho de que los nucleósidos de arabinosa, o arabinósidos, originalmente descubiertos en la esponja marina *Cryptotethya crypta* (Bergmann y Feeney, 1950), poseen propiedades antitumorales. Concretamente, el citosín-arabinósido, distribuido comercialmente como Cytarabine, se emplea en el tratamiento de afecciones hematológicas como leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica aguda o determinados

tipos de linfoma (Pigneux y cols., 2007). Los estudios actualmente disponibles acerca de la síntesis enzimática de arabinósidos son limitados, y sólo se ha descrito el uso de algunas NdRTs (Fernandez-Lucas y cols., 2010) y NPs mesófilas (Scocca, 1971). TtPyNP y TtPNPII serían por lo tanto las primeras enzimas termófilas para las que se describe este tipo de sustrato.

En cuanto a la flexibilidad en el reconocimiento de bases modificadas, se determinó que las modificaciones que definen cada base nitrogenada natural (p.ej., 6-amino para adenina, 6-oxo para guanina e hipoxantina y 2,4-dioxo para timina y uracilo) resultaban esenciales para el reconocimiento por parte de la correspondiente NP específica y que la sustitución o eliminación de estos sustituyentes supone la abolición de la actividad enzimática. No obstante, se observaron ciertas posiciones en las que las enzimas poseen flexibilidad de reconocimiento, lo que tiene un gran interés aplicado. Concretamente, TtPNPII llevó a cabo la síntesis de 2,6-diaminopurín-2'-desoxirribosa con un rendimiento cercano al obtenido con el sustrato natural 2'-desoxiadenosina. Este nucleósido análogo, así como sus derivados, posee aplicaciones terapéuticas como el tratamiento de procesos inflamatorios (Renzi, 2010), o como antiviral para el tratamiento del VIH (Naesens y cols., 1989). Además, TtPyNP llevó a cabo la síntesis de 5-yodo-2'-desoxiuridina con igual rendimiento que el compuesto natural 2'-desoxiuridina. Los uracilos 5-sustituídos y sus derivados forman una familia de compuestos con múltiples aplicaciones, especialmente la inhibición de la metástasis (Miyadera y cols., 2004). La promiscuidad de TtPyNP en esta posición podría explicarse a través la función que esta enzima desempeña *in vivo*, donde debe reconocer nucleósidos de uracilo y timina. Para llevar a cabo esta doble función, su centro activo se debe configurar de tal forma que permita el acomodo de un metilo en el carbono 5 del anillo de pirimidina (en el caso de la timina), así como otras sustituciones no naturales (p. ej. grupos halógenos), lo que hace de TtPyNP una excelente herramienta para la síntesis de nucleósidos de uracilo 5-sustituídos.

#### **NPs DE *T. thermophilus* COMO BIOCATALIZADOR: MEJORA DE LA ACTIVIDAD Y LA ESTABILIDAD**

Se elaboró un modelo tridimensional de TtPyNP a partir de una estructura homóloga en conformación cerrada con una molécula de sustrato unida. Este modelo, apoyado por los análisis conformacionales por espectroscopía de fluorescencia, permitió elaborar un modelo catalítico de la enzima en el que el reconocimiento del nucleósido se produce a través de la base nitrogenada mediante el establecimiento de enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilo en las posiciones 2 y 4 del anillo de pirimidina y dos residuos básicos (Arg167,

Lys186) y entre la amina secundaria en posición 3 de la pirimidina y el residuo Ser182. Según este modelo, la citosina no podría ser un sustrato de TtPyNP ya que posee una amina en la posición 4, en sustitución del carbonilo, lo que impide la formación de uno de estos enlaces y por consiguiente la unión del sustrato. Técnicas de mutagénesis dirigida como ISM permitirían el intercambio del residuo Arg167 por otro capaz de establecer un enlace de hidrógeno con esta amina y así revertir la especificidad de TtPyNP hacia la citosina y sus derivados.

No se identificó ningún residuo que estableciera una unión directa con la pentosa, ni se ha descrito para otros organismos, por lo que cabe suponer que su reconocimiento viene dado por un encaje físico en el bolsillo de unión de la enzima y no por una interacción específica enzima-sustrato.

Este conocimiento adquirido acerca de la estructura y configuración del centro activo de TtPyNP se aplicó para tratar de aumentar su actividad frente a arabinósidos, para lo cual se siguió la metodología de la evolución dirigida mediante la generación de librerías de mutantes simples para doce residuos cercanos al sitio de unión del nucleósido. Previamente se había observado que la enzima era diez veces más activa en la fosforólisis del nucleósido en configuración  $\beta$  (2'-desoxiuridina) que sobre el isómero  $\alpha$  (ara-U), y una inspección más exhaustiva del entorno del modelo de TtPyNP reveló la presencia del residuo Tyr165, cuya superficie molecular estaba en íntimo contacto con la del carbono 2' de la pentosa, de tal manera que mientras un grupo hidroxilo en configuración  $\beta$  se podría acomodar, la forma  $\alpha$  invadiría el espacio ocupado por la tirosina (Figura 5.1). Este impedimento estérico podría ser la razón subyacente al acusado descenso de actividad observado con este sustrato. Sin embargo, ninguna de las variantes obtenidas por mutagénesis dirigida de este residuo conllevó un aumento de la actividad, ya que sólo se observaron mutantes inactivos o con actividad inferior a la de la enzima silvestre. Lo mismo ocurrió para otras nueve de las doce librerías de mutantes que se generaron, en las que sólo se observó un modesto incremento de la actividad en las variantes de Met62 (10% frente al silvestre) y Lys360 (30-36% frente al silvestre). El hecho de que estos dos últimos residuos fueran los más alejados de la zona de reconocimiento del nucleósido podría indicar que los aminoácidos seleccionados poseen una función estructural esencial para el correcto desempeño de la actividad enzimática, una idea que se vio reforzada tras un posterior alineamiento múltiple con homólogos de TtPyNP, lo que puso de manifiesto una fuerte conservación de los mismos. No obstante, y dado que las librerías generadas estaban compuestas por mutantes sencillos, deberá valorarse la posibilidad de elaborar librerías con dobles mutantes, especialmente Tyr165/XXX, ya que podrían generar variantes en las que los desequilibrios introducidos por la sustitución de la tirosina fueran

mitigados por la variante introducida en una segunda posición. Sin embargo, debido al tamaño de las librerías resultantes, el análisis por HPLC sería inviable debido a su lentitud. Por lo tanto se deberá desarrollar un método de cribado biológico que permita una rápida selección de los mutantes mejorados. Para ello, proponemos la selección biológica empleando cepas de *T. thermophilus* auxótrofas para uracilo para la expresión de los mutantes. De este modo, las variantes con mayor actividad fosforolítica frente a *ara*-U generarían mayor concentración intracelular de uracilo, lo que permitiría a la célula sobreponerse a la auxotrofia. Sin embargo, este método posee ciertas limitaciones que deberán ser abordadas, como la selección de un medio de crecimiento adecuado para la cepa empleada y el rango de linealidad del método de selección.

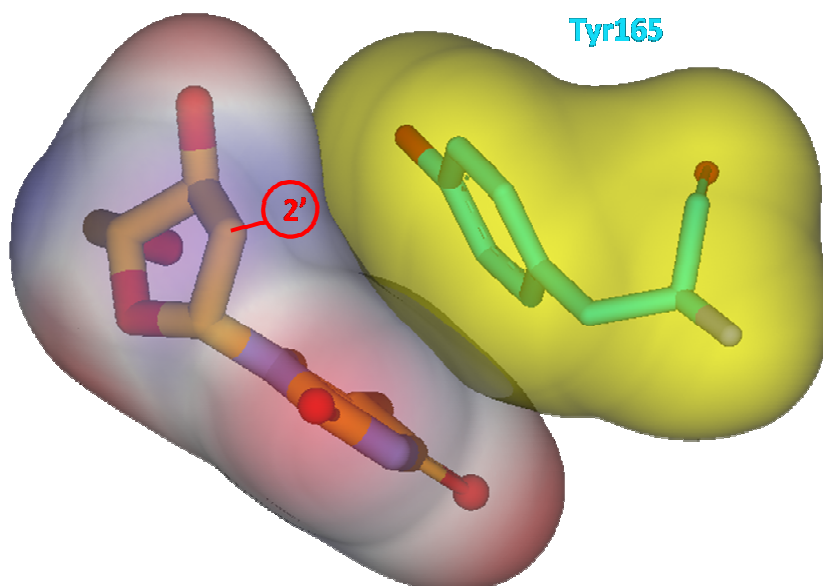


Figura 5.1 En la orientación de Tyr165 en el centro activo de TtPyNP, su superficie molecular se encuentra en contacto íntimo con la pentosa del nucleósido. En ésta posición la ribosa, que posee un grupo hidroxilo en configuración  $\alpha$  (hacia fuera de la imagen) en posición 2', encajaría correctamente, mientras que el hidroxilo en configuración  $\beta$  del *ara*-U (hacia dentro de la imagen) entraría en impedimento estérico con el anillo aromático de la tirosina.

Como punto final se estudió el impacto que la inmovilización sobre diferentes soportes sólidos tuvo sobre la actividad y la estabilidad de las enzimas caracterizadas a lo largo del trabajo. Las enzimas reaccionaron de manera distinta a cada uno de los diferentes soportes empleados. Así, mientras TtPNPI retuvo cerca del 70% de actividad sobre todos los soportes, TtPNPII sufrió un acusado descenso de actividad, e incluso desactivación completa, sobre la

mayoría de soportes de unión por interacción iónica, siendo el mejor resultado el obtenido con la PEI, que presentó una retención de la actividad del 67%. Debido a la ausencia de un cristal resuelto de TtPNPII al que referir esta sensibilidad de la actividad enzimática a la inmovilización, a pesar de que se trata de un monómero excepcionalmente estable en su forma soluble, solo podemos especular que, dado que la inmovilización posee una direccionalidad determinada por la unión de las lisinas de la proteína con los soportes, el centro activo de la enzima podría quedar inaccesible para el sustrato, lo que se traduciría en una pérdida aparente de actividad enzimática. Por otro lado, TtPyNP mostró sensibilidad a los soportes iónicos y a EC-EP, el cual está funcionalizado con grupos epóxido de cadena corta, a la vez que se observó el mejor resultado para el derivado inmovilizado en PEI. Una vez más, y debido a la limitada información disponible acerca de la estructura de cada proteína, solo se puede especular acerca de los motivos subyacente al descenso de actividad observado, pero podría explicarse por distorsiones estructurales introducidas durante la interacción enzima-soporte (p. ej. interacciones hidrofóbicas iniciales con EC-EP), que dejarían la enzima inmovilizada en una conformación inactiva, o bien por la pérdida de flexibilidad que impide el movimiento de dominios durante la catálisis.

No obstante, y a pesar de la pérdida de actividad observada tras la inmovilización, la ya de por sí excelente termoestabilidad previamente exhibida por las NPs de *T. thermophilus* HB27 se vio incrementada de manera notable. La inmovilización de TtPNPI y TtPNPII condujo a incrementos relativamente modestos de la vida media a 80°C (del 360% y 208%, respectivamente), y en estos casos el soporte que mejor resultado obtuvo fue el EC-HFA, que está funcionalizado con grupos aminoepóxido. No obstante, el incremento más espectacular fue el experimentado por TtPyNP, cuya vida media en su forma soluble se había observado previamente a las 1,8 horas de incubación a 80°C, y tras su inmovilización en PEI ésta se situó en 43 horas. Este llamativo efecto del PEI sobre la termoestabilidad de TtPyNP podría de nuevo explicarse por la funcionalidad del dímero propuesta por Pugmire y Ealick (Pugmire y Ealick, 2002), ya que la enzima soluble se vería rápidamente desactivada por disociación termodinámica de la estructura cuaternaria, mientras que al inmovilizarse sobre PEI, que forma una malla que envuelve a la enzima, esta disociación se prevendría y se incrementaría la vida útil de la enzima.



## CONSIDERACIONES FINALES

A lo largo del presente trabajo hemos identificado y expresado tres NPs termoestables del microorganismo termófilo *T. thermophilus* HB27 que han exhibido una excelente resistencia a diversos parámetros fisicoquímicos como la temperatura, la acidez o la presencia de disolventes orgánicos. La disponibilidad de tres enzimas cuyas propiedades permiten el trabajo en condiciones agresivas permitirá desarrollar nuevos procesos de síntesis en los que el empleo de NPs mesófilas se ve limitado o impedido. Asimismo, su resistencia intrínseca abre la posibilidad de integrar estas enzimas en procesos mixtos de síntesis química y enzimática para llevar a cabo reacciones consecutivas en el mismo reactor, eliminando pasos intermedios y reduciendo costes. De este modo, los análogos de nucleósidos que, debido a sus propiedades terapéuticas, tienen un gran impacto sanitario, podrán abaratar su precio de mercado y se harán más accesibles al público, especialmente en las poblaciones económicamente más desfavorecidas.



## **CONCLUSIONES**

---



## 6 CONCLUSIONES

Como fruto del presente trabajo se extrajeron las siguientes conclusiones principales:

1. Once cepas de *T. thermophilus* exhiben actividad nucleósido sintasa por transglicosilación entre un nucleósido donador y una base aceptora.
2. Se han clonado, expresado y purificado cinco proteínas codificadas en *T. thermophilus* HB27 con similitud con nucleósido fosforilasas. Tres de las proteínas poseen actividad nucleósido fosforilasa y por lo tanto se han denominado TtPNPI, TtPNPII y TtPyNP.
3. TtPNPI es específica de nucleósidos de 6-oxopurina, TtPNPII de 6-aminopurina y TtPyNP de uracilo y timina. Ninguna enzima reconoce nucleósidos de citosina y las tres son selectivas frente a nucleósidos de 2'-desoxirribosa.
4. Las tres enzimas son activas a temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua, mantienen la actividad tras meses almacenadas a 4°C y tanto TtPNPI como TtPNPII poseen una excepcional estabilidad a 80°C y frente a solventes orgánicos.
5. Mediante ultracentrifugación analítica se ha podido demostrar que TtPNPI es un homohexámero, TtPNPII un monómero y TtPyNP un homodímero.
6. TtPNPII es activa en la síntesis de nucleósidos de 2,6-diaminopurina y TtPyNP en la de nucleósidos de 5-yodouracilo, ambos compuestos con propiedades terapéuticas. Ambas enzimas poseen también una capacidad limitada para aceptar nucleósidos de arabinosa.
7. Se ha obtenido un modelo tridimensional de TtPyNP que permite explicar su mecanismo catalítico. Los aminoácidos próximos a su centro activo son muy relevantes para la actividad sobre nucleósidos de arabinosa, siendo tolerados únicamente cambios en los más alejados.
8. Las tres enzimas se han inmovilizado sobre diferentes soportes sólidos. La inmovilización lleva asociada un descenso de la actividad enzimática y un aumento de la termoestabilidad. El mejor efecto observado es en el derivado de TtPyNP inmovilizado en polietilenimina, para el que se ha determinado una vida media a 80°C de 43 horas, frente a las 1,8 horas observadas para la enzima soluble.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---





## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Afshar, S., Sawaya, M. R. y Morrison, S. L. (2009). Structure of a mutant human purine nucleoside phosphorylase with the prodrug, 2-fluoro-2'-deoxyadenosine and the cytotoxic drug, 2-fluoroadenine. *Protein Science*, **18**(5): 1107-1114.
- al-Habori, M. (1995). Microcompartmentation, metabolic channelling and carbohydrate metabolism. *Int J Biochem Cell Biol*, **27**(2): 123-132.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**(17): 3389-3402.
- Anand, R., Kaminski, P. A. y Ealick, S. E. (2004). Structures of purine 2'-deoxyribosyltransferase, substrate complexes, and the ribosylated enzyme intermediate at 2.0 Å resolution. *Biochemistry*, **43**(9): 2384-2393.
- Atomi, H. (2005). Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. *Curr Opin Chem Biol*, **9**(2): 166-173.
- Auerbach, G., Ostendorp, R., Prade, L., Korndorfer, I., Dams, T., Huber, R. y Jaenicke, R. (1998). Lactate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: the crystal structure at 2.1 Å resolution reveals strategies for intrinsic protein stabilization. *Structure*, **6**(6): 769-781.
- Averhoff, B. y Muller, V. (2010). Exploring research frontiers in microbiology: recent advances in halophilic and thermophilic extremophiles. *Res Microbiol*, **161**(6): 506-514.
- Beck, W. S. y Levin, M. (1963). Purification, kinetics, and repression control of bacterial trans-N-deoxyribosylase. *J Biol Chem*, **238**: 702-709.
- Becker, P., Abu-Reesh, I., Markossian, S., Antranikian, G. y Markl, H. (1997). Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. *Appl Microbiol Biotechnol*, **48**(2): 184-190.
- Becquerel, P. (1950). La suspension de la vie au dessous de 1/20 K absolu par demagnetization adiabatique de l'alun de fer dans le vide les plus élevé. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Paris*, **231**: 261-263.
- Bergmann, W. y Feeney, R. J. (1950). The isolation of a new thymine pentoside from sponges<sup>1</sup>. *Journal of the American Chemical Society*, **72**(6): 2809-2810.
- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer, E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. y Tasumi, M. (1978). The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **185**(2): 584-591.
- Bershtein, S. y Tawfik, D. S. (2008). Advances in laboratory evolution of enzymes. *Curr Opin Chem Biol*, **12**(2): 151-158.
- Betancor, L., Hidalgo, A., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R. y Guisan, J. M. (2003). Preparation of a stable biocatalyst of bovine liver catalase using immobilization and postimmobilization techniques. *Biotechnol Prog*, **19**(3): 763-767.
- Betbeder, D., Hutchinson, D. W. y Richards, A. O. (1989). The stereoselective enzymatic synthesis of 9-beta-D-2'-deoxyribofuranosyl 1-deazapurine. *Nucleic Acids Res*, **17**(11): 4217-4222.
- Blake, P. R., Park, J. B., Bryant, F. O., Aono, S., Magnuson, J. K., Eccleston, E., Howard, J. B., Summers, M. F. y Adams, M. W. (1991). Determinants of protein hyperthermostability: purification and amino acid sequence of rubredoxin from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus* and secondary structure of the zinc adduct by NMR. *Biochemistry*, **30**(45): 10885-10895.
- Bloch, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H. W. y Stetter, K. O. (1997). *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. *Extremophiles*, **1**(1): 14-21.
- Boston, P. (1999). The search for extremophiles on earth and beyond. what is extreme here may be just business-as-usual elsewhere. <http://www.astrobiology.com/adastra/extremophiles.html>.
- Brady, D. y Jordaán, J. (2009). Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol Lett*, **31**(11): 1639-1650.
- Brady, D., Steenkamp, L., Skein, E., Chaplin, J. A. y Reddy, S. (2004). Optimisation of the enantioselective biocatalytic hydrolysis of naproxen ethyl ester using ChiroCLEC-CR. *Enzyme and Microbial Technology*, **34**(3-4): 283-291.
- Brock, T. D. (1985). Life at high temperatures. *Science*, **230**(4722): 132-138.

- Brock, T. D. y Freeze, H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol*, **98**(1): 289-297.
- Bruins, M. E., Janssen, A. E. y Boom, R. M. (2001). Thermozyms and their applications: a review of recent literature and patents. *Appl Biochem Biotechnol*, **90**(2): 155-186.
- Bruns, N. y Tiller, J. C. (2005). Amphiphilic network as nanoreactor for enzymes in organic solvents. *Nano Lett*, **5**(1): 45-48.
- Buchholz, K. y Kasche, V. (1997). Biokatalysatoren und Enzymtechnologie, 7-11. Weinheim, Wiley-VCH.
- Bzowska, A., Kulikowska, E. y Shugar, D. (2000). Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. *Pharmacol Ther*, **88**(3): 349-425.
- Cao, L. (2005). Immobilised enzymes: science or art? *Curr Opin Chem Biol*, **9**(2): 217-226.
- Cava, F., Hidalgo, A. y Berenguer, J. (2009). *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles*, **13**(2): 213-231.
- Cava, F., Laptenko, O., Borukhov, S., Chahlafl, Z., Blas-Galindo, E., Gomez-Puertas, P. y Berenguer, J. (2007). Control of the respiratory metabolism of *Thermus thermophilus* by the nitrate respiration conjugative element NCE. *Mol Microbiol*, **64**(3): 630-646.
- Cava, F., Zafra, O., da Costa, M. S. y Berenguer, J. (2008). The role of the nitrate respiration element of *Thermus thermophilus* in the control and activity of the denitrification apparatus. *Environ Microbiol*, **10**(2): 522-533.
- Ciccarelli, F. D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey, C. J., Snel, B. y Bork, P. (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*, **311**(5765): 1283-1287.
- Condezo, L. A., Fernandez-Lucas, J., Garcia-Burgos, C. A., Alcantara, A. R. y Sinisterra, J. V. (2006). Enzymatic synthesis of modified nucleosides, 401-423. Boca Raton, CRC Press.
- Chaudhary, K., Ting, L. M., Kim, K. y Roos, D. S. (2006). *Toxoplasma gondii* Purine Nucleoside Phosphorylase Biochemical Characterization, Inhibitor Profiles, and Comparison with the *Plasmodium falciparum* Ortholog. *Journal of Biological Chemistry*, **281**(35): 25652-25658.
- Chien, A., Edgar, D. B. y Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol*, **127**(3): 1550-1557.
- Chivian, D., Brodie, E. L., Alm, E. J., Culley, D. E., Dehal, P. S., DeSantis, T. Z., Gihring, T. M., Lapidus, A., Lin, L. H., Lowry, S. R., Moser, D. P., Richardson, P. M., Southam, G., Wanger, G., Pratt, L. M., Andersen, G. L., Hazen, T. C., Brockman, F. J., Arkin, A. P. y Onstott, T. C. (2008). Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within Earth. *Science*, **322**(5899): 275-278.
- Da Costa, M. S., Nobre, M. F. y Rainey, F. (2001). Genus *Thermus*. *Bergey's Man Syst Bacteriol*, **1**: 404-414.
- Daniel, R. M. y Cowan, D. A. (2000). Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cell Mol Life Sci*, **57**(2): 250-264.
- Daniel, R. M. y Danson, M. J. (1995). Did primitive microorganisms use nonhem iron proteins in place of NAD/P? *Journal of Molecular Evolution*, **40**(6): 559-563.
- de Koning, H. y Dhallinas, G. (2000). Nucleobase transporters (review). *Mol Membr Biol*, **17**(2): 75-94.
- De Rosa, M., Gambacorta, A. y Gliozzi, A. (1986). Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiol Rev*, **50**(1): 70-80.
- Desbruyères, D. y Laubier, L. (1980). *Alvinella pompejana* gen. sp. nov., Ampharetidae aberrant des sources hydrothermales de la ride Est-Pacifique. *Oceanologica Acta*, **3**(3): 267-274.
- Driscoll, J. S., Siddiqui, M. A., Ford, H., Kelley, J. A., Roth, J. S., Mitsuya, H., Tanaka, M. y Marquez, V. E. (1996). Lipophilic, Acid-Stable, Adenosine Deaminase-Activated Anti-HIV Prodrugs for Central Nervous System Delivery. 3. 6-Amino Prodrugs of 2'-β-Fluoro-2',3'-dideoxyinosine. *Journal of Medicinal Chemistry*, **39**(8): 1619-1625.
- Edmonds, C. G., Crain, P. F., Gupta, R., Hashizume, T., Hocart, C. H., Kowalak, J. A., Pomerantz, S. C., Stetter, K. O. y McCloskey, J. A. (1991). Posttranscriptional modification of tRNA in thermophilic archaea (Archaeobacteria). *J Bacteriol*, **173**(10): 3138-3148.
- Elander, R. P. (2003). Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*, **61**(5-6): 385-392.
- Erwin, T. L. (1996). Biodiversity at its utmost: Tropical forest beetles, En: Biodiversity II. Understanding and protecting our biological resources, 27-40. Washington D.C., Joseph Henry Press.
- Facchiano, A. M., Colonna, G. y Ragone, R. (1998). Helix stabilizing factors and stabilization of thermophilic proteins: an X-ray based study. *Protein Engineering*, **11**(9): 753-760.

- Fang, Y., Huang, X. J., Chen, P. C. y Xu, Z. K. (2011). Polymer materials for enzyme immobilization and their application in bioreactors. *BMB Rep*, **44**(2): 87-95.
- Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C. M., Rodriguez, V., Santana, C., Soler, G., Bastida, A. y Guisán, J. M. (1993). Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme and Microbial Technology*, **15**(7): 546-550.
- Fernandez-Lucas, J., Acebal, C., Sinisterra, J. V., Arroyo, M. y de la Mata, I. (2010). *Lactobacillus reuteri* 2'-Deoxyribosyltransferase, a Novel Biocatalyst for Tailoring of Nucleosides. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**(5): 1462-1470.
- Fernandez-Lucas, J., Condezo, L. A., Martinez-Lagos, F. y Sinisterra, J. V. (2007). Synthesis of 2'-deoxyribosyl nucleosides using new 2'-deoxyribosyltransferase microorganism producers. *Enzyme Microb Technol*, **40**: 1147-1155.
- Fernandez-Lucas, J., Fresco-Taboada, A., Acebal, C., de la Mata, I. y Arroyo, M. (2011). Enzymatic synthesis of nucleoside analogues using immobilized 2'-deoxyribosyltransferase from *Lactobacillus reuteri*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **91**(2): 317-327.
- Ferrero, M. y Gotor, V. (2000). Chemoenzymatic Transformations in Nucleoside Chemistry. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*, **131**(6): 585-616.
- Fields, P. A. (2001). Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, **129**(2-3): 417-431.
- Finn, R. D., Tate, J., Misty, J., Coghill, P. C., Sammut, S. J., Hotz, H.-R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S. R., Sonnhammer, E. L. L. y Bateman, A. (2008). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, **36**(suppl 1): D281-D288.
- Forster, P. (1998). Were our ancestors actually hyperthermophiles? Viewpoint of a devil's advocate. En: *Thermophiles: The Keys to Molecular Evolution and the Origins of Life*, 137-146. London, Taylor and Francis.
- Fox, K. R. (2000). Targeting DNA with triplexes. *Curr Med Chem*, **7**(1): 17-37.
- Friedman, S. M. y Oshima, T. (1989). Polyamines of sulfur-dependent archaeobacteria and their role in protein synthesis. *J Biochem*, **105**(6): 1030-1033.
- Galmarini, C. M., Mackey, J. R. y Dumontet, C. (2002). Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol*, **3**(7): 415-424.
- García, J., Fernández, S., Ferrero, M., Sanghvi, Y. S. y Gotor, V. (2004). A mild, efficient and regioselective enzymatic procedure for 5'-O-benzoylation of 2'-deoxynucleosides. *Tetrahedron Letters*, **45**: 1709-1712.
- Garg, R., Gupta, S. P., Gao, H., Babu, M. S., Debnath, A. K. y Hansch, C. (1999). Comparative Quantitative Structure-Activity Relationship Studies on Anti-HIV Drugs. *Chem Rev*, **99**(12): 3525-3602.
- Gliozzi, A., Paoli, G., De Rosa, M. y Gambacorta, A. (1983). Effect of isoprenoid cyclization on the transition temperature of lipids in thermophilic archaeobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **735**(2): 234-242.
- Goodenough, P. W. y Jenkins, J. A. (1991). Protein engineering to change thermal stability for food enzymes. *Biochem Soc Trans*, **19**(3): 655-662.
- Gregson, M., Ayres, B. E., Ewan, G. B., Ellis, F. y Knight, J. (1999). 2,6-Di (substituted amino) purine ribonucleoside analogues and administration to treat respiratory inflammation. Glaxo Group Limited.
- Griffiths, E. y Gupta, R. S. (2004). Distinctive protein signatures provide molecular markers and evidence for the monophyletic nature of the *Deinococcus-Thermus* phylum. *J Bacteriol*, **186**(10): 3097-3107.
- Griffiths, E. y Gupta, R. S. (2007). Identification of signature proteins that are distinctive of the *Deinococcus-Thermus* phylum. *Int Microbiol*, **10**(3): 201-208.
- Grogan, D. W. (1998). Hyperthermophiles and the problem of DNA instability. *Mol Microbiol*, **28**(6): 1043-1049.
- Grogan, J. L., Kremsner, P. G., Deelder, A. M. y Yazdanbakhsh, M. (1998). Antigen-specific proliferation and interferon-gamma and interleukin-5 production are down-regulated during *Schistosoma haematobium* infection. *J Infect Dis*, **177**(5): 1433-1437.
- Guidetti, R. y Jönsson, K. I. (2002). Long-term anhydrobiotic survival in semi-terrestrial micrometazoans. *Journal of Zoology*, **257**(2): 181-187.
- Gupta, R. S. (2000). The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, **24**(4): 367-402.
- Haki, G. D. y Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol*, **89**(1): 17-34.

- Hamamoto, T., Noguchi, T. y Midorikawa, Y. (1996). Purification and characterization of purine nucleoside phosphorylase and pyrimidine nucleoside phosphorylase from *Bacillus stearothermophilus* TH 6-2. *Biosci Biotechnol Biochem*, **60**(7): 1179-1180.
- Hamamoto, T., Noguchi, T. y Midorikawa, Y. (1997). Cloning of purine nucleoside phosphorylase II gene from *Bacillus stearothermophilus* TH 6-2 and characterization of its gene product. *Biosci Biotechnol Biochem*, **61**(2): 276-280.
- Hamamoto, T., Okuyama, K., Noguchi, T. y Midorikawa, Y. (1997). Cloning and expression of purine nucleoside phosphorylase I gene from *Bacillus stearothermophilus* TH 6-2. *Biosci Biotechnol Biochem*, **61**(2): 272-275.
- Hamner, W. M., Hamner, P. P., Strand, S. W. y Gilmer, R. W. (1983). Behavior of Antarctic Krill, *Euphausia superba*: Chemoreception, Feeding, Schooling, and Molting. *Science*, **220**(4595): 433-435.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**(4): 557-580.
- Heider, J., Mai, X. y Adams, M. W. (1996). Characterization of 2-ketoisovalerate ferredoxin oxidoreductase, a new and reversible coenzyme A-dependent enzyme involved in peptide fermentation by hyperthermophilic archaea. *J Bacteriol*, **178**(3): 780-787.
- Henne, A., Bruggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O., Martinez-Arias, R., Jacobi, C., Starkuviene, V., Schlenczek, S., Dencker, S., Huber, R., Klenk, H.-P., Kramer, W., Merkl, R., Gottschalk, G. y Fritz, H.-J. (2004). The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat Biotech*, **22**(5): 547-553.
- Hensel, R. y König, H. (1988). Thermoadaptation of methanogenic bacteria by intracellular ion concentration. *FEMS Microbiology Letters*, **49**(1): 75-79.
- Hiratsuka, T., Furihata, K., Ishikawa, J., Yamashita, H., Itoh, N., Seto, H. y Dai, T. (2008). An Alternative Menaquinone Biosynthetic Pathway Operating in Microorganisms. *Science*, **321**(5896): 1670-1673.
- Hogrefe, H. H., Cline, J., Youngblood, G. L. y Allen, R. M. (2002). Creating randomized amino acid libraries with the QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit. *Biotechniques*, **33**(5): 1158-1160, 1162, 1164-1155.
- Holguin-Hueso, J. y Cardinaud, R. (1972). Enzymic synthesis of 9- and 7-(2'-beta-D-deoxyriboseyl) xanthine. *FEBS Lett*, **20**(2): 171-173.
- Holguin, J. y Cardinaud, R. (1975). Trans-N-deoxyribosylase: purification by affinity chromatography and characterization. *Eur J Biochem*, **54**(2): 505-514.
- Hori, N., Watanabe, M., Sunagawa, K., Uehara, K. y Mikami, Y. (1991). Production of 5-methyluridine by immobilized thermostable purine nucleoside phosphorylase and pyrimidine nucleoside phosphorylase from *Bacillus stearothermophilus* JTS 859. *J Biotechnol*, **17**(2): 121-131.
- Horikawa, D. D., Sakashita, T., Katagiri, C., Watanabe, M., Kikawada, T., Nakahara, Y., Hamada, N., Wada, S., Funayama, T., Higashi, S., Kobayashi, Y., Okuda, T. y Kuwabara, M. (2006). Radiation tolerance in the tardigrade *Milnesium tardigradum*. *International Journal of Radiation Biology*, **82**(12): 843-848.
- Hosokawa, N., Naganawa, H., Kasahara, T., Hattori, S., Hamada, M., Takeuchi, T., Yamamoto, S., Tsuchiya, K. S. y Hori, M. (1999). Futosine and its derivatives, new nucleoside analogs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **47**(7): 1032-1034.
- Huang, M. C., Montgomery, J. A., Thorpe, M. C., Stewart, E. L., Secrist, J. A., 3rd y Blakley, R. L. (1983). Formation of 3-(2'-deoxyribofuranosyl) and 9-(2'-deoxyribofuranosyl) nucleosides of 8-substituted purines by nucleoside deoxyribosyltransferase. *Arch Biochem Biophys*, **222**(1): 133-144.
- Hudson, R. C., Ruttersmith, L. D. y Daniel, R. M. (1993). Glutamate dehydrogenase from the extremely thermophilic archaeobacterial isolate AN1. *Biochim Biophys Acta*, **1202**(2): 244-250.
- Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**(1): 23-28.
- Iwabe, N., Kuma, K., Hasegawa, M., Osawa, S. y Miyata, T. (1989). Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(23): 9355-9359.
- Iwasaki, T., Wakagi, T., Isogai, Y., Tanaka, K., Iizuka, T. y Oshima, T. (1994). Functional and evolutionary implications of a [3Fe-4S] cluster of the dicluster-type ferredoxin from the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. *J Biol Chem*, **269**(47): 29444-29450.
- Iwasaki, T., Wakagi, T. y Oshima, T. (1995). Ferredoxin-dependent redox system of a thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. Purification and characterization of a novel reduced ferredoxin-reoxidizing iron-sulfur flavoprotein. *J Biol Chem*, **270**(30): 17878-17883.
- Jäckel, C., Kast, P. y Hilvert, D. (2008). Protein design by directed evolution. *Annu. Rev. Biophys.*, **37**: 153-173.
- Jenney, F. E., Jr. y Adams, M. W. (2008). The impact of extremophiles on structural genomics (and vice versa). *Extremophiles*, **12**(1): 39-50.

- Johnson, J. L., Rajagopalan, K. V., Mukund, S. y Adams, M. W. (1993). Identification of molybdopterin as the organic component of the tungsten cofactor in four enzymes from hyperthermophilic Archaea. *J Biol Chem*, **268**(7): 4848-4852.
- Jönsson, K. I., Rabbow, E., Schill, R. O., Harms-Ringdahl, M. y Rettberg, P. (2008). Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Current Biology*, **18**(17): R729-R731.
- Kaledin, A. S., Sliusarenko, A. G. y Gorodetskii, S. I. (1980). [Isolation and properties of DNA polymerase from extreme thermophilic bacteria *Thermus aquaticus* YT-1]. *Biokhimiia*, **45**(4): 644-651.
- Kaminski, P. A. (2002). Functional cloning, heterologous expression, and purification of two different N-deoxyribosyltransferases from *Lactobacillus helveticus*. *J Biol Chem*, **277**(17): 14400-14407.
- Kaminski, P. A., Dacher, P., Dugué, L. y Pochet, S. (2008). In Vivo Reshaping the Catalytic Site of Nucleoside 2'-Deoxyribosyltransferase for Dideoxy- and Didehydronucleosides via a Single Amino Acid Substitution. *Journal of Biological Chemistry*, **283**(29): 20053-20059.
- Kanehisa, M. y Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, **28**(1): 27-30.
- Kanehisa, M., Goto, S., Furumichi, M., Tanabe, M. y Hirakawa, M. (2010). KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, **38**(suppl 1): D355-D360.
- Karshikoff, A. y Ladenstein, R. (2001). Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: a "traffic rule" for hot roads. *Trends Biochem Sci*, **26**(9): 550-556.
- Kashefi, K. y Lovley, D. R. (2003). Extending the upper temperature limit for life. *Science*, **301**(5635): 934.
- Kataeva, I. A., Uversky, V. N. y Ljungdahl, L. G. (2003). Calcium and domain interactions contribute to the thermostability of domains of the multimodular cellobiohydrolase, CbhA, a subunit of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Biochem J*, **372**(Pt 1): 151-161.
- Kates, M. (1993). Membrane lipids of archaea. In: *The Biochemistry of Archaea*, 261-296. Amsterdam, Elsevier.
- Kengen, S. W., de Bok, F. A., van Loo, N. D., Dijkema, C., Stams, A. J. y de Vos, W. M. (1994). Evidence for the operation of a novel Embden-Meyerhof pathway that involves ADP-dependent kinases during sugar fermentation by *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry*, **269**(26): 17537-17541.
- Kholodenko, B. N., Sakamoto, N., Puigjaner, J., Westerhoff, H. V. y Cascante, M. (1996). Strong control on the transit time in metabolic channelling. *FEBS Lett*, **389**(2): 123-125.
- Kholodenko, B. N., Westerhoff, H. V. y Cascante, M. (1996). Effect of channelling on the concentration of bulk-phase intermediates as cytosolic proteins become more concentrated. *Biochem J*, **313** ( Pt 3): 921-926.
- Kikuchi, A. y Asai, K. (1984). Reverse gyrase--a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA. *Nature*, **309**(5970): 677-681.
- Klein, J. y Ziehr, H. (1990). Immobilization of microbial cells by adsorption. *J Biotechnol*, **16**(1-2): 1-15.
- Kouisni, L. y Rochefort, D. (2009). Confocal microscopy study of polymer microcapsules for enzyme immobilisation in paper substrates. *Journal of Applied Polymer Science*, **111**(1): 1-10.
- Krenitsky, T. A., Koszalka, G. W. y Tuttle, J. V. (1981). Purine nucleoside synthesis, an efficient method employing nucleoside phosphorylases. *Biochemistry*, **20**(12): 3615-3621.
- Krenkova, J. y Foret, F. (2004). Immobilized microfluidic enzymatic reactors. *Electrophoresis*, **25**(21-22): 3550-3563.
- Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F. J. y Alcalde, M. (2008). Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. *Process Biochemistry*, **43**(2): 169-178.
- Kunkel, T. A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**(2): 488-492.
- Laemmli, U. K. y Favre, M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J Mol Biol*, **80**(4): 575-599.
- Lalonde, J. y Margolin, A. (2002). Immobilization of Enzymes. En: *Enzyme catalysis in organic chemistry*, Weinheim, Wiley-VCH.
- Langworthy, T. A. y Pond, J. L. (1986). *Thermophiles: General Molecular and Applied Microbiology*, 107-134. New York, Wiley-Interscience.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. y Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**(21): 2947-2948.

- Legrain, C., Demarez, M., Glansdorff, N. y Pierard, A. (1995). Ammonia-dependent synthesis and metabolic channelling of carbamoyl phosphate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Microbiology*, **141**: 1093-1099.
- Lennox, E. S. (1955). Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*, **1**(2): 190-206.
- Levene, P. A. y Medigreceanu, F. (1911). On nucleases. *J Biol Chem*, **9**: 65-83.
- Lewkowicz, E. S. y Iribarren, A. M. (2006). Nucleoside Phosphorylases. *Current Organic Chemistry*, **10**(11): 1197-1215.
- Li, W. F., Zhou, X. X. y Lu, P. (2005). Structural features of thermozymes. *Biotechnol Adv*, **23**(4): 271-281.
- Lowry, O. H., Passonneau, J. V. y Rock, M. K. (1961). The stability of pyridine nucleotides. *J Biol Chem*, **236**: 2756-2759.
- Macnutt, W. S. (1952). The enzymically catalysed transfer of the deoxyribosyl group from one purine or pyrimidine to another. *Biochem J*, **50**(3): 384-397.
- Mahmoudian, M., Rudd, B. A. M., Cox, B., Drake, C. S., Hall, R. M., Stead, P., Dawson, M. J., Chandler, M., Livermore, D. G., Turner, N. J. y Jenkins, G. (1998). A versatile procedure for the generation of nucleoside 5'-carboxylic acids using nucleoside oxidase. *Tetrahedron*, **54**(28): 8171-8182.
- Mai, X. y Adams, M. W. (1994). Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. A new enzyme involved in peptide fermentation. *J Biol Chem*, **269**(24): 16726-16732.
- Manaia, C. M., Hoste, B., Gutierrez, M. C., Gillis, M., Ventosa, A., Kersters, K. y da Costa, M. S. (1994). Halotolerant *Thermus* strains from marine and terrestrial hot springs belong to *Thermus thermophilus* (ex Oshima and Imahori, 1974) nom. rev. emend. *Syst Appl Microbiol*, **17**: 526-532.
- Margolin, A. L., Borcherding, D. R., Wolf-Kugel, D. y Margolin, N. (1994). AMP Deaminase as a Novel Practical Catalyst in the Synthesis of 6-Oxopurine Ribosides and their Analogs. *The Journal of Organic Chemistry*, **59**(24): 7214-7218.
- Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol*, **3**: 208-218.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R. y Guisan, J. M. (2000). Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnology and Bioengineering*, **68**(1): 98-105.
- Mateo, C., Archelas, A., Fernandez-Lafuente, R., Manuel Guisan, J. y Furstoss, R. (2003). Enzymatic transformations. Immobilized *A. niger* epoxide hydrolase as a novel biocatalytic tool for repeated-batch hydrolytic kinetic resolution of epoxides. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **1**(15): 2739-2743.
- Matsumura, M., Signor, G. y Matthews, B. W. (1989). Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature*, **342**(6247): 291-293.
- Mendes, P., Kell, D. B. y Westerhoff, H. V. (1996). Why and when channelling can decrease pool size at constant net flux in a simple dynamic channel. *Biochim Biophys Acta*, **1289**(2): 175-186.
- Mesbah, N. M. y Wiegel, J. (2008). Life at Extreme Limits. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1125**(1): 44-57.
- Mikhailopulo, I. A. (2007). Biotechnology of nucleic acid constituents - state of the art and perspectives. *Current Organic Chemistry*, **11**: 317-335.
- Miyadera, K., Emura, T., Wierzb, K. y Yamada, Y. (2004) Cancerous metastasis inhibitors containing uracil derivatives. Taiho Pharmaceutical Company Limited.
- Moris, F. y Gotor, V. (1992). A novel and convenient route to 3'-carbonates from unprotected 2'-deoxy nucleosides through an enzymic reaction. *The Journal of Organic Chemistry*, **57**(8): 2490-2492.
- Moris, F. y Gotor, V. (1993). A useful and versatile procedure for the acylation of nucleosides through an enzymic reaction. *The Journal of Organic Chemistry*, **58**(3): 653-660.
- Mukund, S. y Adams, M. W. (1991). The novel tungsten-iron-sulfur protein of the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, is an aldehyde ferredoxin oxidoreductase. Evidence for its participation in a unique glycolytic pathway. *J Biol Chem*, **266**(22): 14208-14216.
- Naesens, L., Balzarini, J., Rosenberg, I., Holý, A. y De Clercq, E. (1989). 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)-2,6-diaminopurine (PMEDAP): A novel agent with anti-human immunodeficiency virus activity in vitro and potent anti-moloney murine sarcoma virus activity in vivo. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **8**(12): 1043-1047.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M. y Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**(6): 711-729.

- Okuyama, K., Hamamoto, T., Noguchi, T. y Midorikawa, Y. (1996). Molecular cloning and expression of the pyrimidine nucleoside phosphorylase gene from *Bacillus stearothermophilus* TH 6-2. *Biosci Biotechnol Biochem*, **60**(10): 1655-1659.
- Omelchenko, M. V., Wolf, Y. I., Gaidamakova, E. K., Matrosova, V. Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Daly, M. J., Koonin, E. V. y Makarova, K. S. (2005). Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance. *BMC Evol Biol*, **5**: 57.
- Pal, D. y Chakrabarti, P. (1999). Estimates of the loss of main-chain conformational entropy of different residues on protein folding. *Proteins*, **36**(3): 332-339.
- Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R. y Guisan, J. M. (2002). Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**(6): 775-783.
- Panke, S., Held, M. y Wubbolts, M. (2004). Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Curr Opin Biotechnol*, **15**(4): 272-279.
- Patching, S. G., Baldwin, S. A., Baldwin, A. D., Young, J. D., Gallagher, M. P., Henderson, P. J. F. y Herbert, R. B. (2005). The nucleoside transport proteins, NupC and NupG, from *Escherichia coli*: specific structural motifs necessary for the binding of ligands. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **3**(3): 462-470.
- Pereira, S. L., Grayling, R. A., Lurz, R. y Reeve, J. N. (1997). Archaeal nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(23): 12633-12637.
- Pigneux, A., Perreau, V., Jourdan, E., Vey, N., Dastugue, N., Huguet, F., Sotto, J.-J., Salmi, L. R., Ifrah, N. y Reiffers, J. (2007). Adding lomustine to idarubicin and cytarabine for induction chemotherapy in older patients with acute myeloid leukemia: the BGMT 95 trial results. *Haematologica*, **92**(10): 1327-1334.
- Pochet, S., Dugue, L., Meier, A. y Marliere, P. (1995). ChemInform Abstract: Enzymatic Synthesis of 1-(2-Deoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)imidazole-4- carboxamide, a Simplified DNA Building Block. *ChemInform*, **26**(49): no-no.
- Pritchard, L., Corne, D., Kell, D., Rowland, J. y Winson, M. (2005). A general model of error-prone PCR. *J Theor Biol*, **234**(4): 497-509.
- Pugmire, M. J. y Ealick, S. E. (2002). Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. *Biochem J*, **361**(Pt 1): 1-25.
- Ramirez-Arcos, S., Fernandez-Herrero, L. A. y Berenguer, J. (1998). A thermophilic nitrate reductase is responsible for the strain specific anaerobic growth of *Thermus thermophilus* HB8. *Biochim Biophys Acta*, **1396**(2): 215-227.
- Ramirez, F. y Marecek, J. F. (1980). Coordination of magnesium with adenosine 5'-diphosphate and triphosphate. *Biochim Biophys Acta*, **589**(1): 21-29.
- Reetz, M. T. y Carballeira, J. D. (2007). Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat Protoc*, **2**(4): 891-903.
- Reetz, M. T. y Jaeger, K. E. (1998). Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. *Chem Phys Lipids*, **93**(1-2): 3-14.
- Renzi, P. W., CA), Allam, Mustapha (Montréal, CA), Allakhverdi, Zoulfia (Montréal, CA) (2010) Methods for increasing in vivo efficacy of oligonucleotides and inhibiting inflammation in mammals. Topigen Pharmaceutique, Inc. (Montreal, Quebec, CA).
- Ring, K., Henkel, B., Valenteijn, A. y Guterman, R. (1986). Studies on the permeability and stability of liposomes derived from a membrane spanning bipolar archaeobacterial tetraetherlipid. En: Liposomes as drug carriers, 101-2123. Stuttgart, Thieme.
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D. S., Lin, S. W., Dunn, J. J. y Studier, F. W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, **56**(1): 125-135.
- Roy, J. J. y Abraham, T. E. (2004). Strategies in Making Cross-Linked Enzyme Crystals. *ChemInform*, **35**(50): no-no.
- Rozzell, J. D. (1999). Commercial scale biocatalysis: myths and realities. *Bioorg Med Chem*, **7**(10): 2253-2261.
- Russell, R. J. M., Ferguson, J. M. C., Hough, D. W., Danson, M. J. y Taylor, G. L. (1997). The Crystal Structure of Citrate Synthase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* at 1.9 Å Resolution. *Biochemistry*, **36**(33): 9983-9994.
- Russell, R. J. M., Gerike, U., Danson, M. J., Hough, D. W. y Taylor, G. L. (1998). Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium. *Structure*, **6**(3): 351-361.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y T., M. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, N. Y., Cold Spring Harbor.
- Santaniello, E., Ciuffreda, P. y Alessandrini, L. (2005). Synthesis of Modified Purine Nucleosides and Related Compounds Mediated by Adenosine Deaminase (ADA) and Adenylate Deaminase (AMPDA). *ChemInform*, **36**(29): no-no.

- Santos, J. C., Paula, A. V., Nunes, G. F. M. y de Castro, H. F. (2008). *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane-polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **52-53**: 49-57.
- Santos, J. C., Paula, A. V., Rocha, C. G. F., Nunes, G. F. M. y de Castro, H. F. (2008). Morphological and mechanical properties of hybrid matrices of polysiloxane-polyvinyl alcohol prepared by sol-gel technique and their potential for immobilizing enzyme. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **354**(42-44): 4823-4826.
- Saravanan, K., Barlow, H. C., Barton, M., Calvert, A. H., Golding, B. T., Newell, D. R., Northen, J. S., Curtin, N. J., Thomas, H. D. y Griffin, R. J. (2011). Nucleoside Transport Inhibitors: Structure–Activity Relationships for Pyrimido[5,4-d]pyrimidine Derivatives That Potentiate Pemetrexed Cytotoxicity in the Presence of  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein. *Journal of Medicinal Chemistry*, **54**(6): 1847-1859.
- Sayers, J. R., Krekel, C. y Eckstein, F. (1992). Rapid high-efficiency site-directed mutagenesis by the phosphorothioate approach. *Biotechniques*, **13**(4): 592-596.
- Scocca, J. J. (1971). Purification and Substrate Specificity of Pyrimidine Nucleoside Phosphorylase from *Haemophilus influenzae*. *J. Biol. Chem.*, **246**(21): 6606-6610.
- Schäfer, T., Selig, M. y Schönheit, P. (1993). Acetyl-CoA synthetase (ADP forming) in archaea, a novel enzyme involved in acetate formation and ATP synthesis. *Archives of Microbiology*, **159**(1): 72-83.
- Scholz, S., Sonnenbichler, J., Schafer, W. y Hensel, R. (1992). Di-myo-inositol-1,1'-phosphate: a new inositol phosphate isolated from *Pyrococcus woesei*. *FEBS Lett*, **306**(2-3): 239-242.
- Schwartzman, D. W. y Lineweaver, C. H. (2004). The hyperthermophilic origin of life revisited. *Biochem Soc Trans*, **32**(Pt 2): 168-171.
- Sellek, G. A. y Chaudhuri, J. B. (1999). Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles - negatively charged groups artificially introduced into alpha-chymotrypsin provide additional activation and stabilisation effects. *Enzyme and Microbial Technology*, **25**: 471-482.
- Sen, S., Venkata Dasu, V. y Mandal, B. (2007). Developments in directed evolution for improving enzyme functions. *Appl Biochem Biotechnol*, **143**(3): 212-223.
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **349**(8-9): 1289-1307.
- Sheldon, R. A., Schoevaart, R. y Van Langen, L. M. (2005). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatalysis and Biotransformation*, **23**(3-4): 141-147.
- Siebers, B. y Hensel, R. (1993). Glucose catabolism of the hyperthermophilic archaeum *Thermoproteus tenax*. *FEMS Microbiology Letters*, **111**(1): 1-7.
- Simeo, Y., Sinisterra, J. V. y Alcantara, A. R. (2009). Regioselective enzymatic acylation of pharmacologically interesting nucleosides in 2-methyltetrahydrofuran, a greener substitute for THF. *Green Chemistry*, **11**(6): 855-862.
- Smith, E. T., Blamey, J. M. y Adams, M. W. (1994). Pyruvate ferredoxin oxidoreductases of the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*, and the hyperthermophilic bacterium, *Thermotoga maritima*, have different catalytic mechanisms. *Biochemistry*, **33**(4): 1008-1016.
- St. Clair, N. L. y Navia, M. A. (1992). Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *Journal of the American Chemical Society*, **114**(18): 7314-7316.
- Stemmer, W. P. C. (1994). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**: 10747–10751.
- Straathof, A. J., Panke, S. y Schmid, A. (2002). The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol*, **13**(6): 548-556.
- Tahirov, T. H., Inagaki, E., Ohshima, N., Kitao, T., Kuroishi, C., Ukita, Y., Takio, K., Kobayashi, M., Kuramitsu, S., Yokoyama, S. y Miyano, M. (2004). Crystal Structure of Purine Nucleoside Phosphorylase from *Thermus thermophilus*. *Journal of Molecular Biology*, **337**(5): 1149-1160.
- Takayama, G., Kosuge, T., Maseda, H., Nakamura, A. y Hoshino, T. (2004). Nucleotide sequence of the cryptic plasmid pTT8 from *Thermus thermophilus* HB8 and isolation and characterization of its high-copy-number mutant. *Plasmid*, **51**(3): 227-237.
- Tanaka, R., Kunisada, T., Kushida, N., Yamada, K., Ikeda, S., Noike, M., Ono, Y., Itoh, N., Takami, H., Seto, H. y Daiiri, T. (2011). Branched fatty acids inhibit the biosynthesis of menaquinone in *Helicobacter pylori*. *J Antibiot (Tokyo)*, **64**(1): 151-153.



- Taran, S. A., Verevkin, K. N., Feofanov, S. A. y Miroshnikov, A. I. (2009). [Enzymatic transglycosylation of natural and modified nucleosides by immobilized thermostable nucleoside phosphorylases from *Geobacillus stearothermophilus*]. *Bioorg Khim*, **35**(6): 822-829.
- Tetas, M. y Lowenstein, J. M. (1963). The effect of bivalent metal ions on the hydrolysis of adenosine di- and triphosphate. *Biochemistry*, **2**: 350-357.
- Tolner, B., Poolman, B. y Konings, W. N. (1997). Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **118**(3): 423-428.
- Trelles, J. A., Bentancor, L., Schoijet, A., Porro, S., Lewkowicz, E. S., Sinisterra, J. V. y Iribarren, A. M. (2004). Immobilized *Escherichia coli* BL21 as a Catalyst for the Synthesis of Adenine and Hypoxanthine Nucleosides. *Chemistry & Biodiversity*, **1**(2): 280-288.
- Trelles, J. A., Bentancor, L., Schoijet, A., Porro, S., Lewkowicz, E. S., Sinisterra, J. V. y Iribarren, A. M. (2004). Immobilized *Escherichia coli* BL21 as a catalyst for the synthesis of adenine and hypoxanthine nucleosides. *Chem Biodivers*, **1**(2): 280-288.
- Trelles, J. A., Valino, A. L., Runza, V., Lewkowicz, E. S. y Iribarren, A. M. (2005). Screening of Catalytically Active Microorganisms for the Synthesis of 6-Modified Purine Nucleosides. *Biotechnology Letters*, **27**(11): 759-763.
- van de Vossenberg, J. L., Driessen, A. J. y Konings, W. N. (1998). The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles*, **2**(3): 163-170.
- Vieille, C., Burdette, D. S. y Zeikus, J. G. (1996). Thermozyms. *Biotechnol Annu Rev*, **2**: 1-83.
- Vieille, C., Epting, K. L., Kelly, R. M. y Zeikus, J. G. (2001). Bivalent cations and amino-acid composition contribute to the thermostability of *Bacillus licheniformis* xylose isomerase. *Eur J Biochem*, **268**(23): 6291-6301.
- Vieille, C. y Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev*, **65**(1): 1-43.
- Vogt, G., Woell, S. y Argos, P. (1997). Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *J Mol Biol*, **269**(4): 631-643.
- Wachtershauser, G. (1998). In: Thermophiles: the Keys to Molecular Evolution and the Origin of Life?, 47-57. Philadelphia, Taylor and Francis.
- Walsh, K. A., Daniel, R. M. y Morgan, H. W. (1983). A soluble NADH dehydrogenase (NADH: ferricyanide oxidoreductase) from *Thermus aquaticus* strain T351. *Biochem J*, **209**(2): 427-433.
- Wang, G., Xia, J., Xie, X., Xu, Q. y Chen, N. (2010). [Molecular cloning, gene expression and characterization of purine nucleoside phosphorylase from *Pseudoalteromonas* sp. XM2107]. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, **50**(2): 222-227.
- Watanabe, I. (1987). [48] Acrylamide production method using immobilized nitrilase-containing microbial cells. *Methods in Enzymology*. M. Klaus, Academic Press. **Volume 136**: 523-530.
- Weisburg, W. G., Giovannoni, S. J. y Woese, C. R. (1989). The Deinococcus-Thermus phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction. *syst appl microbiol*, **11**: 128-134.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, **51**(2): 221-271.
- Woese, C. R., Kandler, O. y Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**(12): 4576-4579.
- Zhang, Y., Wu, H., Li, J., Li, L., Jiang, Y., Jiang, Y. y Jiang, Z. (2007). Protamine-Templated Biomimetic Hybrid Capsules: Efficient and Stable Carrier for Enzyme Encapsulation†. *Chemistry of Materials*, **20**(3): 1041-1048.
- Zhang, Y., Wu, H., Li, L., Li, J., Jiang, Z., Jiang, Y. y Chen, Y. (2009). Enzymatic conversion of Baicalin into Baicalein by [beta]-glucuronidase encapsulated in biomimetic core-shell structured hybrid capsules. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **57**(1-4): 130-135.





